

Aus dem Biochemischen Institut Freiburg i.Br.

Direktor: Professor Dr. Helmut H o l z e r

Studien zur Biosynthese von Thymin-
nucleotiden in Escherichia coli

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

H o h e n M e d i z i n i s c h e n F a k u l t ä t

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br.

vorgelegt

von

E D I T H F Ö R S T E R

geboren in

Wurzen

1966

aus dem Bibliotheklichen Institut Freiburg i. Br.

Direktor: Professor Dr. Heinrich Heine

Studien zur Biographie von Theodor
Mörike in der Geschichte der

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Biochemischen Institut Freiburg i.Br.

Direktor: Professor Dr. Helmut H o l z e r

Studien zur Biosynthese von Thymin-
nucleotiden in Escherichia coli

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

H o h e n M e d i z i n i s c h e n F a k u l t ä t

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br.

vorgelegt

von

E D I T H F Ö R S T E R

geboren in

Wurzen

1966



Dekan: Professor Dr. Hans-U. Z o l l i n g e r

Referent: Professor Dr. Helmut H o l z e r

Über wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit berichtete die Verfasserin am 23.4.1965 auf einer Tagung der "Federation of European Biochemical Societies" in Wien unter dem Titel "Alternative Pathways of Thymidine Triphosphate Biosynthesis in *E. coli*" und am 8.10.1965 in Berlin auf einer Tagung der "Gesellschaft für Physiologische Chemie" unter dem Titel "Reinigung und Eigenschaften einer Desoxycytidin-Desaminase aus *Escherichia coli*".

Inhalt

	Seite
0 Einleitung	1
0.1 Stellung der Thyminnucleotide im Stoffwechsel	1
0.11 Thyminnucleotide als DNS-Baustein	1
0.12 Nucleotidverteilung in der Zelle	3
0.13 Regelfunktionen bei der Nucleotidsynthese	5
0.14 Coenzymfunktionen	6
0.2 Bekannte Wege der Biosynthese von Thyminnucleo- tiden	7
0.21 Thymidylatsynthetase	7
0.22 Vorstufenverwertung	9
0.23 Methylaspartat-Hypothese	11
1 Material und Methoden	12
1.1 Biologisches Material	12
1.11 Verwendete Organismen	12
1.12 Verwendete Nährböden	12
1.13 Gewinnung zellfreier Extrakte	13
1.2 Analytisch-chemische Methoden	13
1.21 Proteinbestimmung	13
1.22 Orthophosphatbestimmung	13
1.23 Konzentrationsbestimmung	14
1.24 Radioaktivitätsmessung	14
1.25 Chromatographische Methoden	14
1.3 Präparative Methoden	17
1.31 Aktivierung von Kohle	17
1.32 Bereitung von Triäthylamin-Bicarbonat-Puffer	17
1.33 Vorbehandlung von Ionenaustauschern für Säulen- chromatographie	18
1.34 5-Methyldeoxycytidin-5'-triphosphat-Präpara- tion	19
1.35 Herstellung von 4-N-Hydroxy-Desoxycytidin, 4-N-Hydroxy-5-Methyl-Desoxycytidin, 6-Azacytidin	25
1.36 Herstellung von Tetrahydrofolsäure	25
1.37 Reinigung der Thymidylatsynthetase aus Kalbs- thymus und aus E. coli	25

II

	Seite
1.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten	25
1.41 Aktivität der Thymidylatsynthetase	25
1.42 Aktivität von Desaminasen	29
1.5 Verwendete Substanzen	32
2 Ergebnisse	33
2.1 Aktivität der Thymidylatsynthetase aus <i>E. coli</i> und Kalbsthymus mit verschiedenen Substraten	33
2.11 Thymidylatsynthetase aus <i>E. coli</i>	33
2.12 Thymidylatsynthetase aus Kalbsthymus	37
2.2 Abhängigkeit der Thyminnucleotidbiosynthese vom Zellwachstum	39
2.3 Einfluß von Thymin, Thymidin und einiger Antimetabolite auf die Enzymaktivität	39
2.4 Thyminnucleotidbiosynthese in thyminlosen Mutanten von <i>E. coli</i>	43
2.5 Versuche zur Identifizierung der Reaktionsprodukte bei der Methylierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat	44
2.51 Papierchromatographie	44
2.52 3-Hydroxychinaldinreaktion	46
2.53 Säulenchromatographie	46
2.6 Desaminierung von Cytosin, Cytosinnucleosiden und Cytosinnucleotiden	54
2.61 Reinigung der Cytosinnucleosiddesaminase aus <i>E. coli</i>	54
2.62 Eigenschaften der Cytosinnucleosiddesaminase	59
2.63 Cytosindesoxyribonucleotiddesaminase aus rohen Extrakten von <i>E. coli</i>	68
2.7 Cytosindesoxyribonucleotidkinasen aus <i>E. coli</i>	72
3 Diskussion	73
4 Zusammenfassung	78
5 Literaturverzeichnis	79

III

Abkürzungen

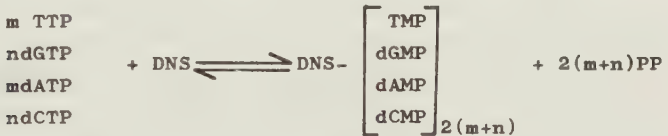
AMP	- Adenosin-5'-monophosphat
ADP	- Adenosin-5'-diphosphat
ATP	- Adenosin-5'-triphosphat
dAMP	- Desoxyadenosin-5'-monophosphat
dADP	- Desoxyadenosin-5'-diphosphat
dATP	- Desoxyadenosin-5'-triphosphat
BrdCR	- 5-Bromdesoxycytidin
BrdUR	- 5-Bromdesoxyuridin
C	- Cytosin
CR	- Cytidin
CMP	- Cytidin-5'-monophosphat
CDP	- Cytidin-5'-diphosphat
CTP	- Cytidin-5'-triphosphat
dCR	- Desoxycytidin
dCMP	- Desoxycytidin-5'-monophosphat
dCDP	- Desoxycytidin-5'-diphosphat
dCTP	- Desoxycytidin-5'-triphosphat
DNS	- Desoxyribonucleinsäure
F	- Folsäure
FH ₂	- Dihydrofolsäure
FH ₄	- Tetrahydrofolsäure
FAD	- Flavinadenindinucleotid
dGMP	- Desoxyguanosin-5'-monophosphat
dGDP	- Desoxyguanosin-5'-diphosphat
dGTP	- Desoxyguanosin-5'-triphosphat
MeC	- 5-Methylcytosin
MedCR	- 5-Methyldeoxycytidin
MedCMP	- 5-Methyldeoxycytidin-5'-monophosphat
MedCDP	- 5-Methyldeoxycytidin-5'-diphosphat
MedCTP	- 5-Methyldeoxycytidin-5'-triphosphat
NADP	- Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
OMP	- Orotidin-5'-monophosphat
P	- Orthophosphat
PP	- Pyrophosphat
PRPP	- 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
dPRPP	- 5-Phosphodesoxyribosyl-1-pyrophosphat
RNS	- Ribonucleinsäure

IV

T	- Thymin
dTR	- Thymidin
TMP	- Thymidin-5'-monophosphat
TDP	- Thymidin-5'-diphosphat
TTP	- Thymidin-5'-triphosphat
U	- Uracil
UR	- Uridin
UMP	- Uridin-5'-monophosphat
UDP	- Uridin-5'-diphosphat
UTP	- Uridin-5'-triphosphat
dUR	- Desoxyuridin
dUMP	- Desoxyuridin-5'-monophosphat
dUDP	- Desoxyuridin-5'-diphosphat
dUTP	- Desoxyuridin-5'-triphosphat

0 Einleitung

0.11 Die Pyrimidinbase Thymin ist fast ausschließlich in den Desoxyribonucleinsäuren enthalten und bildet einen charakteristischen Baustein der DNS. Außerdem enthalten die löslichen Ribonucleinsäuren verschiedener Spezies Thymin als sogenannte "seltene Base" (16). Thymin liegt im DNS-Molekül in N-glykosidischer Bindung an Desoxyribosephosphate vor. Die Synthese der makromolekularen DNS erfolgt durch die von KORNBERG (53) aufgeklärte DNS-Polymerase-reaktion. Dabei werden die vier Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate unter Abspaltung von Pyrophosphat zum Makromolekül polymerisiert:



Voraussetzung für den Ablauf der Reaktion ist das Vorliegen eines DNS-Fragmentes, des sogenannten "primers". Zu diesem "primer", der die Reaktion einleitet, wird entsprechend der von WATSON und CRICK (101) aufgedeckten Basenpaarung ein neuer, komplementärer DNS-Strang gebildet. Weiterhin ist für den Ablauf der DNS-Synthese ein ausreichendes Angebot an niedermolekularen Substraten, den Desoxyribonucleosid-5'-triphosphaten, erforderlich. Die Reaktionssequenzen, über die in der Zelle die Synthese dieser Nucleotide erfolgt, sind in ihren Grundzügen bekannt. Die Reaktionen der Purinnucleotidbiosynthese wurden vor allem von BUCHANAN und HARTMAN (zusammenfassende Darstellungen: (18,41,42,44,54,61,83)) aufgeklärt. Die Untersuchungen über den Ablauf der Pyrimidinnucleotidbiosynthese stammen

besonders von REICHARD (86), KORNBERG, LIEBERMAN und SIMMS (54,59,60,61) und YATES und PARDEE (106). Die enzymatischen Reaktionen, die aus den Purin- und Pyrimidin-ribonucleotiden die entsprechenden Purin- und Pyrimidin-desoxyribonucleotide bilden, wurden erst in den letzten Jahren eingehender untersucht. REICHARD und Mitarbeiter wiesen in *E. coli* (9, 88,89) und in tierischen Zellen (71,87) Enzymsysteme nach, durch die Ribonucleosid-5'-diphosphate zu Desoxyribonucleosid-5'-diphosphaten reduziert werden. Diese Enzymsysteme benötigen ein Polypeptid - das Thioredoxin - als Cofaktor für den Wasserstofftransfer zwischen NADPH_2 und den Nucleotiden (57,72).

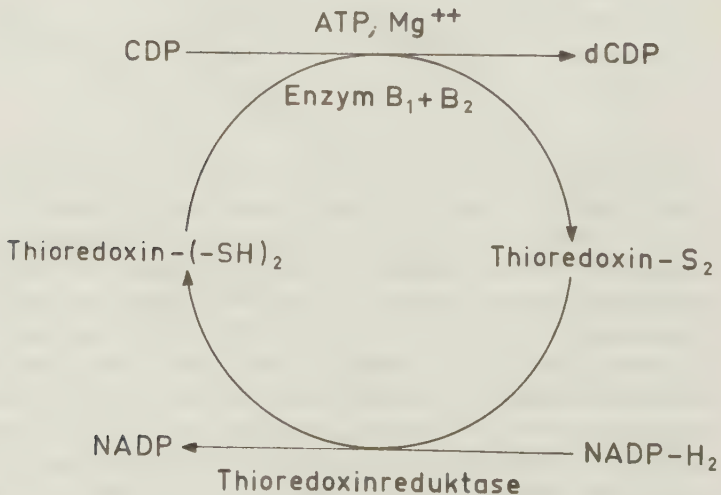


Abb. 1: Das Nucleosid-5'-diphosphatreduktasesystem nach REICHARD (57,72)

Die Reduktion des Thioredoxins wird durch eine spezifische Thioredoxinreduktase (72) katalysiert. Für die Reduktion des Nucleosid-5'-diphosphates sind außer reduziertem Thioredoxin zwei weitere Enzymproteine (Enzym B1 und B2) sowie ATP und Mg^{++} erforderlichlich.

Bei *Lactobacillus Leichmannii* dagegen erfolgt die Reduktion von Nucleosid-5'-monophosphaten (24) oder Nucleosid-5'-triphosphaten (12,14,38) durch Vitamin B_{12} -abhängige Enzymsysteme (7). Eine schematische Übersicht über die Reaktionen der Pyrimidinnucleotidbiosynthese in *E. coli* gibt Abb. 2 wieder.

Beim Studium der Reaktionssequenzen, die zur Biosynthese der Purin- und Pyrimidinnucleotide führen, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Regelmechanismen aufgedeckt. Hervorzuheben sind die Untersuchungen von GERHART und PARDEE (35,36,37), über die allosterische Hemmung der Aspartattranscarbamylase durch Cytosinnucleotide, die Untersuchungen von MAGASANIK und Mitarbeitern (63) über derartige Mechanismen auf verschiedenen Stufen der Purinnucleotidbiosynthese und über die allosterische Beeinflussung der Desoxycytidin-5'-monophosphatdesaminase in tierischen Zellen durch Desoxycytidin-5'-triphosphat und Thymidin-5'-triphosphat von MALEY und MALEY (67). Die theoretischen Grundlagen dieser Regelmechanismen wurden besonders von MONOD, JACOB und CHANGEUX (73,74,75) erarbeitet.

0.12 Bestimmungen der stationären Konzentrationen von Desoxyribonucleotiden in *E. coli* (47) ergaben unterschiedliche Konzentrationen der vier verschiedenen Desoxyribonucleotide.

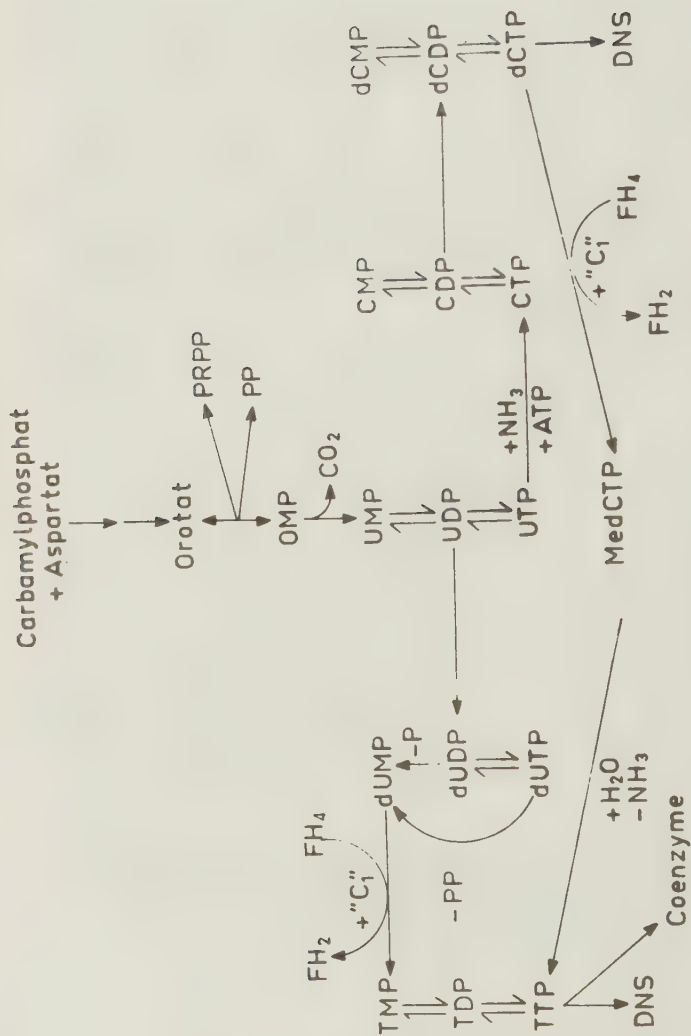


Abb. 2: Übersicht über die Reaktionen der Pyrimidinnucleotidsynthese in *E. coli*

Tabelle 1

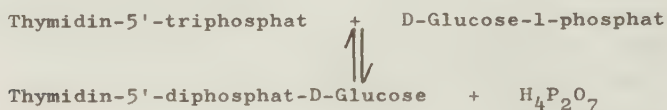
Konzentrationen an freien Desoxyribonucleotiden in E. coli
Bestimmungen erfolgten durch Messung der Aufnahme von ^{14}C -Uracil bzw. ^{14}C -Adenin in die kalte säurelösliche Fraktion einer purin- und pyrimidinlosen Mutante.

Summe von	$\mu\text{Mol/g}$ Zellen (feucht)
dAMP, dADP, dATP	33
dGMP, dGDP, dGTP	19
dCMP, dCDP, dCTP	37
TMP, TDP, TTP	< 3

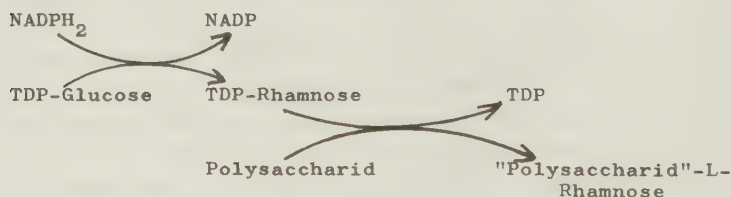
Wie aus der Tabelle ersichtlich, sind die Konzentrationen an Cytosin- und Adenindesoxyribonucleotiden fast doppelt so hoch wie die Konzentration an Guanosindesoxyribonucleotiden und mehr als zehn mal höher als die Konzentration an Thyminindesoxyribonucleotiden. Diese auffallend geringe Konzentration an Thyminindesoxyribonucleotiden stellt die Frage nach ihrer Bedeutung als geschwindigkeitsbegrenzende Größe bei der Bildung von polymerer DNS an der DNS-Polymerase. Der Klärung dieser Frage gilt ein Teil der Experimente, über die in der vorliegenden Arbeit berichtet werden soll.

- 0.13 Neben ihrer Funktion als DNS-Baustein erfüllen die Thyminnucleotide eine weitere Funktion im Zellstoffwechsel, indem sie an der Regulation der Nucleotidsynthese beteiligt sind. Von besonderer Bedeutung sind hier zwei Prozesse: Die Repression der Bildung von Desoxyribonucleosidphosphaten aus Ribonucleosidphosphaten durch Thyminnucleotide (7,10,49) und die allosterische Hemmung der Thymidinkinase durch Thymidin-5'-triphosphat (78,79).

0.14 Die Bedeutung der Thyminnucleotide als Coenzyme wurde ebenfalls erst in den letzten Jahren erkannt. Bei Zuckersynthesen ist besonders Thymidin-5'-diphosphat als Coenzym wirksam. PAZUR und SHUEY (82) konnten zeigen, daß Thymidin-5'-triphosphat in einer Pyrophosphorylasereaktion mit Glucose-1-phosphat zu Thymidin-5'-diphosphat-Glucose umgesetzt werden kann:

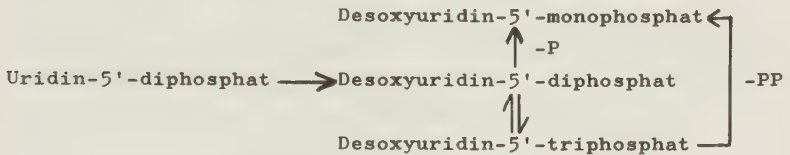


In Bindung an Thymidin-5'-diphosphat kann die Glucose durch NADPH_2 zu Rhamnose reduziert werden. Dieser Zucker ist bei folgenden Übertragungsreaktionen für die Synthese von komplexen bakteriellen Polysacchariden erforderlich (39).



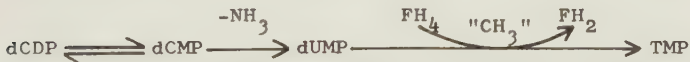
In ähnlichen Reaktionen können auch Mannose-1-phosphat (2,3), Galactose-1-phosphat (77) und Glucosamin-1-phosphat (56) in die entsprechenden Thymidinphosphatderivate überführt und für Polysaccharidsynthesen verwendet werden. Neue Untersuchungen (45) haben gezeigt, daß E. coli bei Störungen im Thyminnucleotidstoffwechsel wesentliche Veränderungen im Aufbau der Zellwandpolysaccharide aufweisen.

0.21 Die Biosynthese der Thyminnucleotide kann auf zwei, prinzipiell verschiedenen, Wegen erfolgen. Die eigentliche de novo Synthese geht von Desoxyuridin-5'-monophosphat aus. Letzteres wird in *E. coli* über folgende Reaktionen gebildet (8):



Das primär gebildete Desoxyuridin-5'-diphosphat wird in Desoxyuridin-5'-monophosphat überführt: entweder direkt unter Orthophosphatabspaltung oder über Desoxyuridin-5'-triphosphat unter Pyrophosphatabspaltung durch spezifische Phosphatasen bzw. Pyrophosphatasen. Durch diese sehr aktiven Enzyme wird an der DNS-Polymerase ein Einbau des Desoxyuridin-5'-triphosphates in die DNS verhindert.

In tierischen Geweben (67,92) sowie in *E. coli* nach Phageninfektion (52) wird Desoxyuridin-5'-monophosphat durch Desaminierung von Desoxycytidin-5'-monophosphat gebildet:



Desoxyuridin-5'-monophosphat wird sowohl bei *E. coli* als auch in tierischem Gewebe unter Beteiligung von Tetrahydrofolsäure durch die Thymidylatsynthetase zu Thymidin-5'-monophosphat methyliert. Diese Reaktion wurde von FRIEDKIN und KORNBERG 1956 entdeckt (31) (Abb. 3).

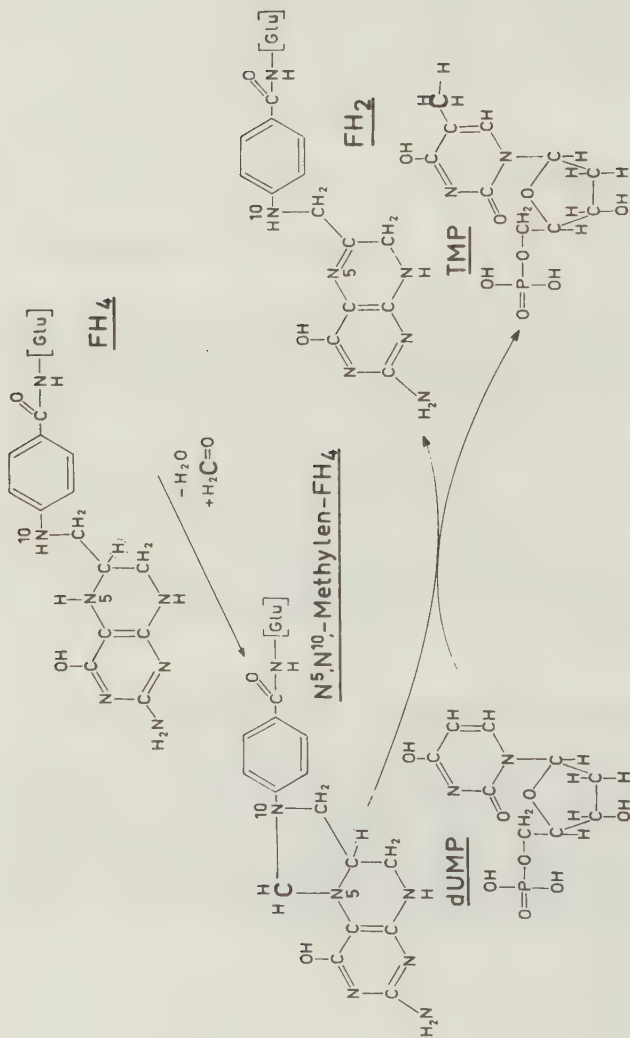
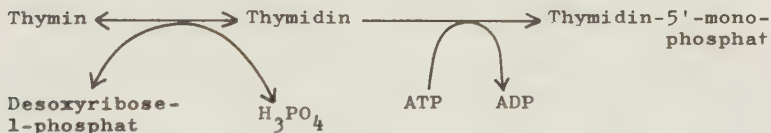


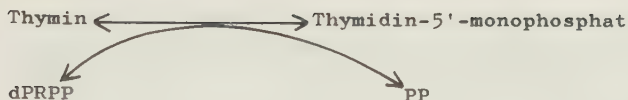
Abb. 3: Der Mechanismus der Thyminnucleotidbiosynthese

Das Enzym konnte aus *E. coli* (33,100), *Streptococcus faecalis* (13,70) und Kalbsthymus (43,51) gereinigt und der Mechanismus der Reaktion eingehend untersucht werden (11,15, 81). Das Acceptor-nucleotid Desoxyuridin-5'-monophosphat übernimmt von der N^5, N^{10} -Methylen-tetrahydrofolsäure eine Hydroxymethylgruppe, die bei dieser Transferreaktion gleichzeitig reduziert wird. Aus Tetrahydrofolsäure entsteht dabei Dihydrofolsäure. Donatoren für die Hydroxymethylgruppe sind vor allem die Aminosäure Serin oder freie C_1 -Verbindungen, z.B. Ameisensäure oder Formaldehyd (Abb. 4).

0.22 Neben dieser de novo Synthese können auch die freie Base Thymin und das Nucleosid Thymidin für die Thyminnucleotidbiosynthese Verwendung finden. Hierbei wird die freie Base wahrscheinlich zunächst durch eine Phosphorylase (85) in das Nucleosid Thymidin überführt und dieses dann mittels ATP durch die Thymidinkinase (78) zu Thymidin-5'-monophosphat umgesetzt:



Dieser Reaktionsablauf ist für die Thyminnucleotidbiosynthese von gewisser Bedeutung im tierischen und pflanzlichen Organismus. In normalen Zellen von *E. coli* werden keine Thyminnucleotide über diese Reaktionsfolge gebildet (102). Bei thyminlosen Mutanten, bei denen der Prozeß der eigentlichen Thyminnucleotid-de-novo-Synthese blockiert ist, scheint eine Verwertung von Thymin bzw. Thymidin über diese Reaktionen möglich zu sein. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß bei diesen Zellen auch eine Thyminnucleotidsynthese aus der freien Base Thymin und 5-Phosphodesoxyribosyl-1-pyrophosphat unter Umgehung der Nucleosidstufe erfolgen kann:



Allerdings konnte bisher 5-Phosphodesoxyribosyl-1-pyrophosphat in lebenden Zellen nicht nachgewiesen werden. Sollte diese Substanz vorkommen, ist, entsprechend dem Verhalten der verwandten Verbindungen 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat und Desoxyribose-1-phosphat (27,32), eine außerordentlich große Labilität anzunehmen,

- 0.23 Eine interessante Möglichkeit der Biosynthese von Thyminnucleotiden wurde von WOOLLEY und KOEHLIK (103) postuliert. Anstelle des Aspartats soll 3-Methylaspartat bei der einleitenden Reaktion der Pyrimidinnucleotidbiosynthese an der Aspartattranscarbamylase (bzw. einem entsprechenden Enzym) umgesetzt werden. Statt Orotsäure wäre die erste Pyrimidinverbindung somit 5-Methylorotsäure. Da die Bildung von 3-Methylaspartat aus Glutamat nur in Gegenwart von Coenzym B_{12} erfolgt (4), könnte diese Reaktion die vielfach geforderte Abhängigkeit der Thyminnucleotidbiosynthese von Vitamin B_{12} bzw. Coenzym B_{12} (1) erklären. Eine experimentelle Bestätigung hat dieser Reaktionsweg bisher nicht erfahren.

In der vorliegenden Arbeit werden zunächst Experimente beschrieben, die dem Nachweis von Regelmechanismen in der Thyminnucleotidbiosynthese dienen. Im Laufe dieser Untersuchungen gelang der Nachweis einer zweiten, völlig anders verlaufenden Reaktionssequenz für die Biosynthese von Thyminnucleotiden. Die Charakterisierung dieser Sequenz bildet den Hauptteil dieser Arbeit.

1 Material und Methoden

1.1 Biologisches Material

1.11 Verwendet werden folgende Organismen:

E. coli B

E. coli 15 (ATCC 9723; Wildstamm)

E. coli 15 T- (ATCC 9723h; thyminlose Mutante)

E. coli 15 T-R₁ und 15 T-R₂ (von uns isolierte Spontan-revertanten von *E. coli* 9723h)

Die Bakterien werden als Dauerkultur bei vierwöchigem Transfer auf DIFCO-Nutrient-Agar gehalten.

1.12 Die Mikroorganismen werden auf folgenden Nährböden gezüchtet:

1. DIFCO-Nutrient-Broth

2. Synthetisches Medium M 63 (91) mit folgender Zusammensetzung:

KH ₂ PO ₄	13.6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 mg
Glycerin	2.0 g
H ₂ O ad	1000 ml

Die Lösung wird mit 2 N KOH auf pH 6.5 - 6.6 eingestellt. Bei der Züchtung von thyminlosen Mutanten wird dem Medium außerdem Thymidin in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt. Die Sterilisation der Medien erfolgt im Autoklaven (15 Min.; 121°C).

Kleinere Kulturen werden durch Schütteln, größere Ansätze durch Einleiten steriler vorgewärmter Preßluft belüftet. Alle Kulturen werden bei 37°C gehalten. Das Beimpfen der größeren Ansätze erfolgt mit 200 ml einer über Nacht bei 37°C auf DIFCO-Nutrient-Broth vorgezüchteten Kultur (Belüftung durch Schütteln). Die Zellen werden, wenn nicht anders angegeben, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugieren geerntet: Kleinere Ansätze

(bis 200 ml) in der Servall-Zentrifuge bei 10 000 x g, 15 Min.; größere Ansätze in der kontinuierlichen Sharples-Zentrifuge bei 40 000 x g unter Wasserkühlung. Anschließend werden die Zellen mit 0.5% NaCl + 0.5% KCl gewaschen und in einer Servall-Zentrifuge bei 10 000 x g erneut abzentrifugiert.

Das Wachstum der Zellen wird, wenn erforderlich, durch Messung der Extinktion bei 650 m μ verfolgt. Dabei ergeben 1×10^8 Zellen eine Extinktion von $E_{650} = 0.085$.

1.13 Gewinnung zellfreier Extrakte

Je 10 g Zellen (Feuchtgewicht) werden mit 30 g Aluminiumoxid (Alcoa A 305, Bacteriological grade) zu einer zähen, feuchten Paste kalt (4°C) verrieben. Die Extraktion erfolgt mit 30 ml eines Tris-HCl-Puffers (0.05 M; pH 7.4).

Zusammensetzung der Pufferlösung:

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl	0.05 M
Mercaptoaethanol	10^{-3} M
Äthylendiaminetetraacetat (= EDTA)	10^{-3} M

Zelltrümmer und Aluminiumoxid werden in einer Servall-Zentrifuge (30 000 x g; 120 Min.) abzentrifugiert. Der Überstand wird als "Rohsaft" für die Versuchsansätze verwendet.

1.2 Analytisch-chemische Methoden

- 1.21 Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt nach der FOLIN-CIOCALTEU-Methode in der Modifikation von LOWRY, ROSEBROUGH et al. (62). Die Eichkurve wird mit Rinder-Serum-Albumin (Behringwerke) aufgenommen. Es besteht ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Extinktion bei E_{750} m μ . 1 Extinktion $E_{750} = 0.100$ entspricht 33 μ g Protein.

- 1.22 Orthophosphat wird nach der Methode von FISKE und SUBBAROW (26) bestimmt.

- 1.23 Konzentrationsbestimmungen von Pyrimidinbasen, Nucleosiden und Nucleotiden erfolgen spektrophotometrisch unter Verwendung der von BEAVEN, HOLIDAY und JOHNSON (6) angegebenen Koeffizienten. Die Absorptionsspektren werden mit dem BECKMAN-Ratio-Recording-Spectrophotometer (Type DK 2) gemessen. Für eine Reihe von Reaktionen werden die Änderungen der Extinktionskoeffizienten neu bestimmt (siehe Tab.3).
- 1.24 Zur Radioaktivitätsmessung werden verwendet:
- 1.241 TRICARB-Liquid-Scintillation-Spectrophotometer (Modell 314)
- Als Scintillationsflüssigkeit dienen folgende Systeme:
- 1.241.1 Dioxan-Dimethoxyäthan-Anisol
(750 ml Dioxan, 125 ml Dimethoxyäthan, 125 ml Anisol, 7.0 g 2,5-Diphenyloxazol und 50 mg 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol)
- 1.242.2 Toluol
(1000 ml Toluol, 4.0 g 2,5-Diphenyloxazol und 1000 mg 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)-Benzol.
- 1.242 Radiopapierchromatograph FH 452 mit Methandurchflußzähler FH 49 der Firma FRIESEKE und HOEPFNER, Erlangen.
- 1.25 Chromatographische Methoden
- 1.251 Alle papierchromatographischen Trennungen werden an Whatman-I-Papier, absteigend und bei 25°C, durchgeführt. Folgende Lösungsmittel finden Verwendung:
- 1.251.1 Isobuttersäure + 0.5 N Ammoniak (10:6) (64)
Laufzeit 17 Std.; pH 3.6 - 3.7
- 1.251.2 Isopropanol + conc. HCl + H₂O (170:41; H₂O ad 250 ml) (104)
Laufzeit 14 Std.
- 1.251.3 Butanol + H₂O (86:14) (69)
Laufzeit 14 Std.

1.251.4 Aceton + 15% Trichloressigsäure (65:35) (19)

Laufzeit 20 Std. bei 4°C

1.251.5 Eine Trennung der Thyminnucleotide in dem von DELAMORE und PRUSOFF angegebenen System gelang uns nicht (23).

Die bei der Chromatographie mit reinen Vergleichssubstanzen erzielten Rf-Werte sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

1.252 Säulenchromatographische Trennungen von Nucleotiden erfolgen an DOWEX- oder an DEAE-Cellulose-Ionenaustauschern. Die Vorbereitung der Ionenaustauscher wird im folgenden Abschnitt, die Ausführung der Chromatographie bei den einzelnen Experimenten beschrieben.

Lineare Gradienten von Pufferlösungen für die Säulenchromatographie werden wie folgt bereitet:

Als Reservoir und als Mischgefäß dienen zwei genau gleiche Zylinder, die am Boden durch einen Schlauch miteinander verbunden sind. Das Mischgefäß steht durch einen dünnen Schlauch mit der Säule in Verbindung. Vor Beginn der Elution werden beide Gefäße gleich hoch gefüllt, das Mischgefäß mit H₂O bzw. mit der Lösung der geringeren Konzentration, das Reservoir mit dem Puffer. Die Konzentration des Gradienten in Abhängigkeit vom Durchflußvolumen läßt sich nach folgender Gleichung berechnen (80a):

$$C_v = C_2 + (C_1 - C_2) \times \frac{v}{V_{\text{gesamt}}}$$

C_v = Konzentration des Elutionsmittels nach dem Durchfluß des Volumens v

V_{gesamt} = das am Anfang in beiden Gefäßen vorhandene Flüssigkeitsvolumen

C_1 = Konzentration der Lösung im Reservoir

C_2 = Anfangskonzentration im Mischgefäß

Tabelle 2

Rf-Werte von Pyrimidinbasen, -nucleosiden und -nucleotiden

Substanz	Lösungsmittel			
	1.251.1	1.251.2	1.251.3	1.251.4
C	0.80	0.44	0.22	--
5-MeC	--	0.52	0.29	--
T	0.78	--	0.52	--
dCR	0.76	0.60	0.20	--
5-MedCR	--	--	0.23	--
dTR	0.70	0.76	0.51	--
dUR	0.67	0.34	0.34	--
dCMP	0.51	0.73	--	--
5-MedCMP	0.60	0.73	--	--
TMP	0.42	0.90	--	0.39
dUMP	--	0.82	--	--
dCDP	0.32	--	--	0.20
5-MedCDP	0.33	--	--	--
TDP	0.23	--	--	0.23
dCTP	0.22	--	--	0.12
5-MedCTP	0.20	--	--	--
TTP	0.11	--	--	0.13
H ₃ PO ₄	--	0.84	--	--

1.3 Präparative Methoden

- 1.31 Für die Reinigung von 5-Methyldesoxycytidin-5'-triphosphat ist während der Präparation aktivierte Kohle erforderlich. Sie wird wie folgt gewonnen:

100 g Norit A (Serva, Heidelberg) werden zunächst 60 Min. bei 50 - 60°C in 2000 ml 1 N HCl und anschließend 60 Min. bei 25°C im gleichen Volumen 1 N NH_4OH gerührt. Sodann wird mit H_2O gewaschen bis pH 7.0 - 7.2 erreicht ist. Die Kohle wird 18 Stunden bei 110°C getrocknet und im Mörser fein pulverisiert.

- 1.32 Bei chromatographischen Trennungen wird versucht, die Nucleotide möglichst salzfrei zu erhalten. Besonders gut gelingt es mit leicht flüchtigen Puffern, z.B. Natrium- oder Triäthylamin-Bicarbonat-Puffern. Von diesen Puffern können sowohl Anionen als auch Kationen durch Verdampfen leicht entfernt werden. Man erhält das eluierte Nucleotidmaterial in rein wässriger Lösung. Der bei den folgenden Präparationen verwendete Triäthylamin-Bicarbonat-Puffer wird folgendermaßen hergestellt (96):

Nach Destillation von Triäthylamin (Merck, Darmstadt) ($K_p = 89^\circ\text{C}$) wird 1 Mol der frisch destillierten Substanz (101 g = 140 ml) in 500 bis 600 ml H_2O gelöst und unter Eiskühlen mit Kohlensäure durchströmt bis pH 7.5 erreicht ist. Mit kaltem H_2O wird auf 1000 ml aufgefüllt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und, wenn erforderlich, durch erneutes Einleiten von CO_2 auf pH 7.5 eingestellt. Die erhaltene Lösung ist 1 M. In der Kälte bleibt der pH-Wert der Lösung über einige Wochen konstant. Verdünnungen des Puffers müssen mit kaltem H_2O erfolgen, um pH-Änderungen durch Entweichen von CO_2 zu vermeiden.

- 1.331 Die Anionenaustauscher DOWEX 1 und DOWEX 2 sowie der Kationenaustauscher DOWEX 50 W (sämtlich Präparate der Firma Serva, Heidelberg; Vernetzungsgrad X8, Korngröße 200 - 400 mesh) werden nach dem gleichen Verfahren vorbereitet:

50 g Austauscher werden in 1000 ml 1 N NaOH suspendiert und 60 Min. gerührt. Die überstehende NaOH (mit feinen Partikeln) wird abgesaugt und der Waschvorgang in gleicher Weise wiederholt. Anschließend wird mit H_2O bis zur Neutralität gewaschen. Hierauf wird der Austauscher in 1000 ml 1 N Ameisensäure suspendiert und 15 Min. in der Säure gerührt. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Schließlich wird mit H_2O gewaschen, bis ein pH-Wert von 6.5 bis 7.0 erreicht ist. Der Anionenaustauscher befindet sich jetzt in der Formiat-Form, der Kationenaustauscher in der H^+ -Form.

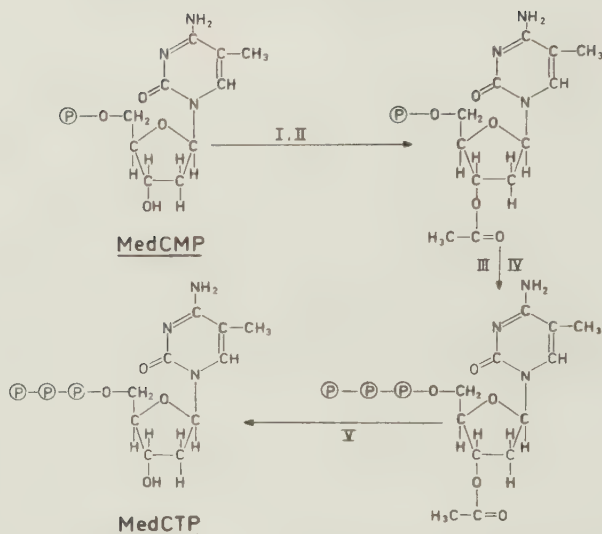
- 1.332 DEAE-Cellulose wird in Anlehnung an eine Vorschrift von STAEHELIN (98) präpariert:

100 g DEAE-Cellulose (MN 2100 DEAE-Cellulose der Firma Macherey, Nagel und Co., Düren; Kapazität ca. 0.7 mequ/g) werden in 2000 ml 0.5 N NaOH suspendiert und 60 Min. gerührt. Nach dem Sedimentieren der Partikel werden feine Teilchen, die über der eigentlichen Masse schweben, mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dann wird der Austauscher bis zur Neutralität mit H_2O (fünf- bis sechsmal) und anschließend dreimal mit je 500 ml 95% Aethanol gewaschen, danach drei- bis viermal wieder mit je 1000 ml H_2O , dann mit 1000 ml 0.5 N NaOH. Schließlich wird wieder mit H_2O gewaschen, bis etwa pH 7 erreicht ist (fünf- bis sechsmal mit je 1000 ml). Nach der Suspension der Cellulose (bei $4^{\circ}C$) in 500 ml 0.01 M Triäthylamin-Bicarbonat-Puffer wird sie in dieser Form für die Beschickung der Säulen verwendet.

- 1.34 Da 5-Methyldesoxycytidin-5'-triphosphat kommerziell nicht erhältlich ist, wird es in Anlehnung an eine Vorschrift von SMITH und KHORANA (96) für Cytidin-5'-triphosphat präparativ hergestellt.

Prinzip: Das Nucleosid-5'-monophosphat 5-MedCMP (aus der DNS von Weizenkeimlingen) wird zunächst mit wasserfreiem Pyridin in Essigsäureanhydrid quantitativ acetyliert, um den Zucker vor den nachfolgenden Reaktionen zu schützen (Reaktion 1). Überschüssiges Essigsäureanhydrid wird durch Hydrolyse zerstört (Reaktion 2). In wasserfreiem Pyridin werden dann mittels Dicyclohexylcarbodiimid unter basischen Bedingungen Phosphatreste mit dem Esterphosphat des Nucleosid-5'-monophosphates kondensiert (Reaktion 3). Die Phosphorylierungsreaktionen (unter basischen Bedingungen; Tributylamin!) werden durch H_2O -Zugabe unterbrochen (Reaktion 4). Zugeseetztes Ammoniak entfernt die schützenden Acetylreste vom Zucker des Nucleosids (Reaktion 5). Es entsteht bei der Reaktion ein Gemisch von Nucleosid-5'-monophosphaten, -diphosphaten, -triphosphaten, -tetraphosphaten und -pentaphosphaten. Diese werden durch Adsorption an Aktivkohle aus dem Reaktionsansatz entfernt und nach Elution von der Kohle säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose getrennt (Abb. 5).

Ausführung: 100 mg (= 311 μ Mol) 5-Methyldesoxycytidin-5'-monophosphat (Calbiochem AG, Luzern) werden in 50 ml H_2O und 4 ml Pyridin (frisch destilliert) gelöst. Die Lösung wird anschließend gefriergetrocknet. Lösen der Substanz in Pyridin und H_2O und nachfolgende Lyophilisation werden mehrmals bis zum Entstehen eines schaumartigen, weißen Pulvers wiederholt. Dieses wird mit 10 ml Pyridin (wasserfrei, frisch destilliert) und 5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Unter Lichtabschluß wird 12 Std. bei 25°C geschüttelt. Die entstehende farblose Lösung bleibt weitere 12 Std. stehen. In diesen 24 Std. erfolgt eine



Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)

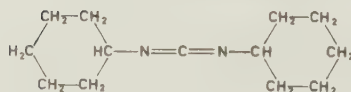


Abb. 5: Präparative Darstellung von MedCTP

- I, II - Acetylierung der Desoxyribose
(Schutzreaktion)
- III, IV - Phosphorylierung mit H_2PO_4 und
Dicyclohexylcarbodiimid
- V - Abspaltung der Schutzgruppe

vollständige Acetylierung des Zuckers. Unter Eiskühlung werden dann 50 ml H_2O zugesetzt. Der Ansatz wird 60 Min. bei 25°C gehalten und anschließend durch Rotationsverdampfen (Badtemperatur unter 30°C) bis zur Trockenheit eingeengt. Der Rückstand wird in 25 ml H_2O gelöst und das Einengen 3-4 mal wiederholt. Schließlich wird der Rückstand in 100 ml H_2O gelöst und lyophilisiert. Auch dieser Vorgang wird wiederholt, bis ein lockeres, weißes Pulver entsteht. Zu dem entstandenen Pulver gibt man 10 ml Pyridin (wasserfrei; frisch destilliert), 600 mg (= 6.1 mMol) conc. H_3PO_4 (86%), 2.5 ml (= 10.5 mMol) Tri-n-Butylamin und 5.15 g (= 25 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid. Dieses Gemisch bleibt 24 Std. bei 25°C im Dunkeln stehen. Bereits nach 60 Min. beginnt die Abscheidung von Dicyclohexylharnstoff. Nachfolgend wird der Ansatz im Rotationsverdampfer (Badtemperatur unter 30°C) erneut bis zur Trockenheit eingeengt, mit 100 ml H_2O und mit 100 ml Aether gewaschen. Unlöslicher Dicyclohexylharnstoff wird durch Filtration abgetrennt. Die Aetherphase wird nochmals mit 100 ml H_2O gewaschen. Die wässrigen Phasen werden vereint und wie zuvor im Rotationsverdampfer (Badtemperatur unter 30°C) bis zur Trockenheit eingeengt. Es verbleibt ein gummiartiger Rückstand, der in 25 ml H_2O sowie in 25 ml conc. NH_3 aufgenommen wird; dabei fällt Tributylamin aus. Der Ansatz bleibt 60 Min. bei 25°C stehen. Anschließend werden 50 ml H_2O und 50 ml Aether zugesetzt. Eine geringe Abscheidung von Dicyclohexylharnstoff wird durch Filtration entfernt. Aetherische und wässrige Phase werden erneut im Scheidetrichter voneinander getrennt und die wässrige Phase zur Entfernung von NH_3 erneut im Rotationsverdampfer (Badtemperatur unter 30°C) eingeengt. Der Rückstand wird in 50 ml H_2O gelöst, mit 1 N Ameisensäure auf pH 3.5 eingestellt und unter Rühren mit 15 g Aktivkohle (Norit A; Aktivierung siehe unten) versetzt. Das Rühren erfolgt über

15 Min. Anschließend wird die Kohle auf einer Nutsche unter leichtem Saugen abgetrennt und mit 500 ml H_2O gewaschen. Die Elution des Nucleotidmaterials von der Kohle erfolgt mit einem Aethanol- NH_3 - H_2O -Gemisch (1000 ml Aethanol + 20 ml conc. NH_3 + 100 ml H_2O). Die Kohle wird durch Abnutschen von der Elutionsflüssigkeit abgetrennt. Eine spektrophotometrische Bestimmung der Nucleotide ergibt eine 85 - 90% Elution des eingesetzten Materials von der Kohle. Das Eluat wird im Rotationsverdampfer (Badtemperatur unter 30°C) auf etwa 100 ml eingengt. Von dieser Restflüssigkeit wird kolloidal gelöste Kohle durch Ultrafiltration (Membranfilter MF 6 der Membranfiltergesellschaft GmbH., Göttingen) mit 2.5 Atü Druck abgetrennt. Das Filtrat wird anschließend weiter bis zur Trockenheit eingengt und der Rückstand erneut in 100 ml H_2O gelöst. Diese Lösung wird anschließend auf eine DEAE-Cellulose-Säule von 33 cm Höhe und 1.5 cm Durchmesser gegeben. Die Vorbereitung der DEAE-Cellulose für die Chromatographie erfolgt entsprechend der Beschreibung im vorhergehenden Abschnitt. Die Säule und die Auffangröhrchen des Fraktionssammlers werden bei $1-3^\circ\text{C}$ gehalten. Eluiert wird mit einem linearen Gradienten von Triäthylammonium-Bicarbonat-Puffer. Das Mischgefäß enthält H_2O , das Reservoir 0.5 M Triäthylammonium-Bicarbonat-Puffer. Die Flußgeschwindigkeit beträgt etwa 50 ml/Std. UV-absorbierende Substanzen (Nucleotide) im Eluat werden mittels LKB-Uvicord-System bei 254 m μ erfaßt. Es werden Fraktionen von 6 ml gesammelt. Das Ergebnis einer derartigen chromatographischen Trennung gibt Abb. 6a wieder. Die den Gipfeln III und IV entsprechenden Fraktionen werden gesammelt, durch Rotationsverdampfen bis zur Trockenheit eingengt und erneut an einer Säule (DEAE-Cellulose, 30 cm Höhe, 1 cm Durchmesser) chromatographiert. Die Elution erfolgt in völlig gleicher Weise wie bei der ersten Säule. Das Ergebnis zeigt Abb. 6b. Die Fraktionen 180 - 220

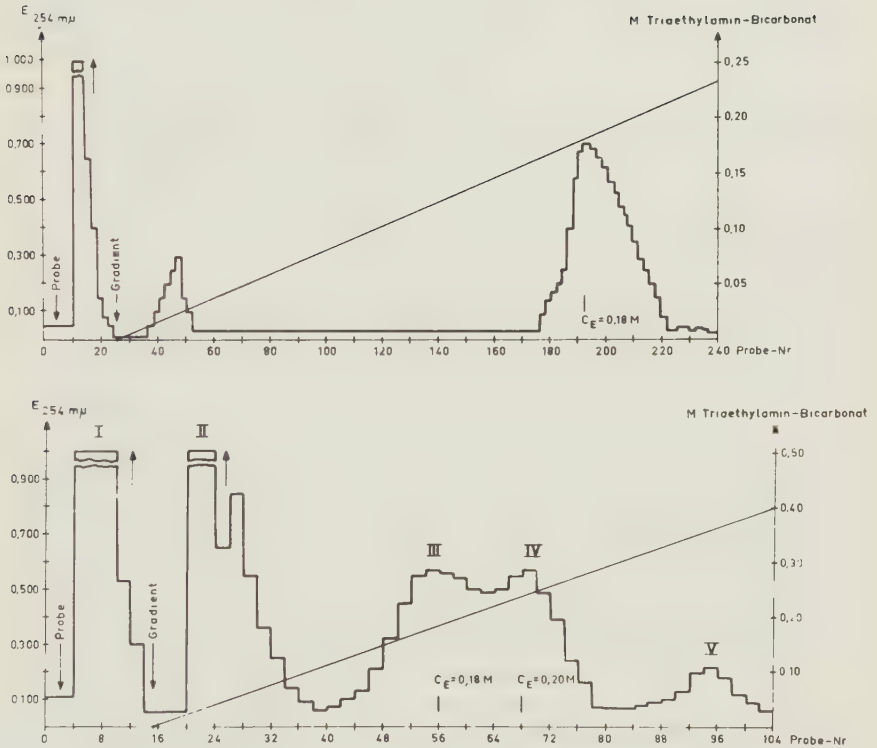


Abb. 6a (untere Kurve): Säulenchromatographische Trennung von MedCMP, MedCDP und MedCTP

Abb. 6b (obere Kurve): Rechromatographie der Gipfel III und IV

dieser Chromatographie werden vereint, durch Rotationsverdampfen (Badtemperatur unter 30°C) bis zur Trockenheit eingeengt, dann in 50 ml H₂O gelöst und lyophilisiert. Das erhaltene Produkt wird durch folgende Kriterien als 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat identifiziert:

1. Die Substanz zeigt eine UV-Absorption bei pH 2.0 mit $\lambda_{\text{max}} = 283 \text{ m}\mu$ (soll: 287 m μ). Bei pH 13.0 verschiebt sich das Absorptionsmaximum nach 274 m μ (soll: 277 m μ). Die Ursache für diese, stets beobachtete, geringe Abweichung der Absorption vom Sollwert konnte nicht geklärt werden.
2. Der Nucleotidgehalt der gewonnenen Substanz wurde unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{287} = 12\,400$ (bei pH 2.0) bestimmt.
3. Phosphatbestimmungen nach FISKE-SUBBAROW (26) ergeben 2.8 - 3.6 Mol Phosphat pro Base. Aufgrund dieser Analysen ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, daß neben 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat auch geringe Mengen 5-Methyl-desoxycytidin-5'-tetraphosphat vorliegen.
4. Papierchromatographisch wandert die Substanz im System Isobuttersäure/Ammoniak (64) mit einem R_f-Wert von 0.20, der dem R_f-Wert des Desoxycytidin-5'-triphosphat entspricht (siehe Tabelle 2, System 1.251.1). Aufgrund der sehr ähnlichen Struktur dürften beide Triphosphate in diesem polaren Lösungsmittel gleiche R_f-Werte haben.

Die Ausbeute an 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat bei verschiedenen Präparationen beträgt 20-25%.

- 1.35 4N-Hydroxy-Desoxycytidin und 4N-Hydroxy-5-Methyl-Desoxycytidin werden nach der Methode von BROWN und SCHELL (17), 6-Azacytidin nach SORM, SMRT und CERNECKIJ (97) dargestellt.
- 1.36 Tetrahydrofolsäure ist in wässriger Lösung sehr instabil. Bei neutralem pH und Zimmertemperatur beträgt die Halblebenszeit der Substanz etwa 20 Min. (84). Durch Zusatz von Mercaptoaethanol läßt sich eine Stabilisierung der Tetrahydrofolsäure erzielen. Alle Lösungen werden deshalb nach folgender Vorschrift hergestellt:
- 18 mg D,L-Tetrahydrofolsäure (SIGMA Chemical Comp., St. Louis, Miss./USA) werden in einer Lösung von 5 ml K-Phosphat-Puffer (0.1 M; pH 7.4), die 0.1 M Mercaptoaethanol enthält, gelöst. Die spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration ($\epsilon_{297} = 26700$; pH 7.5) ergibt 6.5 μ Mol D,L-Tetrahydrofolsäure/ml. Die Lösung ist eingefroren und unter Stickstoffabschluß 8 - 10 Tage verwendbar.
- 1.37 Zum Vergleich der enzymatischen Eigenschaften der Thymidylatsynthetasen aus verschiedenen Organismen wird das Enzym aus Kalbsthymus nach JENNY und GREENBERG (51) und aus E. coli nach FRIEDKIN et al. (33) untersucht. Das Enzym aus Kalbsthymus wurde entsprechend der Vorschrift etwa 200-fach, das aus E. coli etwa 60-fach angereichert.
- 1.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten
- 1.41 Die Aktivität der Thymidylatsynthetase wird nach verschiedenen Methoden bestimmt:
- 1.411 Spektrophotometrischer Test nach WAHBA und FRIEDKIN (99):
Prinzip: Bei der Methylierung von Desoxyuridin-5'-monophosphat zu Thymidin-5'-monophosphat bzw. von Desoxycytidin-5'-triphosphat zu 5-Methyldeoxycytidin-5'-triphosphat dient Formaldehyd als Quelle der Methylgruppe. Formaldehyd bildet in einer spontanen Reaktion mit Tetrahydrofolsäure N⁵,N¹⁰-Methylentetrahydrofolsäure. Von dieser

wird die Methylengruppe unter Reduktion zur Methylgruppe auf das Acceptornucleotid (Desoxyuridin-5'-monophosphat bzw. Desoxycytidin-5'-triphosphat) übertragen (s. Abb. 3). Dabei wird Tetrahydrofolsäure zu Dihydrofolsäure oxidiert. Diese Oxidation ist mit einer Änderung des Extinktionskoeffizienten bei 340 m μ ($\Delta\epsilon_{340} = +6600$) verbunden.

Ausführung:

Testmischung:

Tris-HCl-Puffer (pH 7.4)	0.2 M	6.00 ml
Mercaptoethanol	1 M	3.00 ml
MgCl ₂	1 M	0.75 ml
EDTA	0.1 M	0.30 ml
Formaldehyd	12 M	0.04 ml

1 ml Testmischung wird mit dem gleichen Volumen Enzymlösung, 0.10 ml Tetrahydrofolsäure und 0.03 ml Desoxyuridin-5'-monophosphat bzw. Desoxycytidin-5'-triphosphat (10 μ Mol/ml) versetzt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen = 3.00 ml aufgefüllt. Eine Leerküvette enthält anstelle des Acceptornucleotides H₂O. Die Extinktionsänderung bei 340 m μ wird über 30 Min. (bei Zimmertemperatur; 23°C) verfolgt. Modifikationen werden bei den einzelnen Experimenten angegeben.

1.412 Radioaktive Testsysteme

1.412.1 Messung des Einbaues von ¹⁴C-Formaldehyd in 5-Methyl-Pyrimidinnucleotide

Prinzip: Bei dieser Reaktion wird als Methylgruppendonator ¹⁴C-markierter Formaldehyd verwendet. Die bei der Reaktion entstehenden markierten Nucleotide werden durch Behandlung mit Schlangengift (Crotalus adamanteus; Phosphodiesterase und 5'-Nucleotidase enthaltend) zu den entsprechenden Nucleosiden abgebaut. Überschüssiger ¹⁴C-Formaldehyd wird als Sulfitkomplex abgetrennt. Die markierten Nucleoside werden papierchromatographisch isoliert und der Einbau an Radioaktivität in diese Verbindungen quantitativ bestimmt.

Ausführung:

Testmischung:

D,L-Tetrahydrofolsäure	(6.5 μ Mol/ml)	0.40 ml
dUMP bzw. dCTP	(0.01 M)	0.10 ml
MgCl ₂	(0.1 M)	0.20 ml
Mercaptoaethanol	(0.1 M)	0.30 ml
Tris-HCl-Puffer	(0.1 M; pH 7.5)	1.00 ml
¹⁴ C-Formaldehyd	(0.05 M; 2 x 10 ⁷ Ipm/ml)	0.10 ml

Enzymlösung 0.10 - 0.50 ml

H₂O bis zu einem Gesamtvolumen = 3.00 ml

Modifikationen werden bei den einzelnen Experimenten angegeben. Der Ansatz wird 60 Min. bei 37° C unter Stickstoffabschluß geschüttelt. Durch Erhitzen im kochenden Wasserbad wird die Reaktion abgestoppt und das denaturierte Protein durch Zentrifugieren (10 Min. bei 10 000 x g) entfernt. Der Überstand wird nach Zugabe von 2 mg Schlangengift (s. oben) weitere 30 Min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem Erhitzen im kochenden Wasserbad und anschließender Zentrifugation wird der Überstand mit 0.2 ml einer 0.2 M Lösung von NaHSO₃ versetzt und auf eine Dowex-1/Dowex-50-Säule gegeben. Dimensionen der Säulen: Durchmesser 1 cm; untere Schicht: Dowex-50 (X 8, 200 - 400 mesh, H⁺-Form), Höhe: 3 cm; obere Schicht: Dowex-1 (X 8, 200 - 400 mesh, Formiat-Form), Höhe: 3 cm. Die Nucleoside werden mit 30 ml H₂O eluiert. Das Eluat wird im Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingengt und in 0.5 ml H₂O erneut gelöst. Davon werden 0.2 ml auf Whatman-1-Papier aufgetragen und im System Butanol/H₂O chromatographiert (siehe Tabelle 2, System 1.251.3). Die Radioaktivität wird mit dem Papierchromatographen (siehe 1.242) loaklisiert und im TRICARB-Liquid-Scintillation-Spectrophotometer quantitativ bestimmt (siehe 1.241). Die Auftrennung der entstehenden Nucleoside im Chromatogramm zeigt Abb. 7.

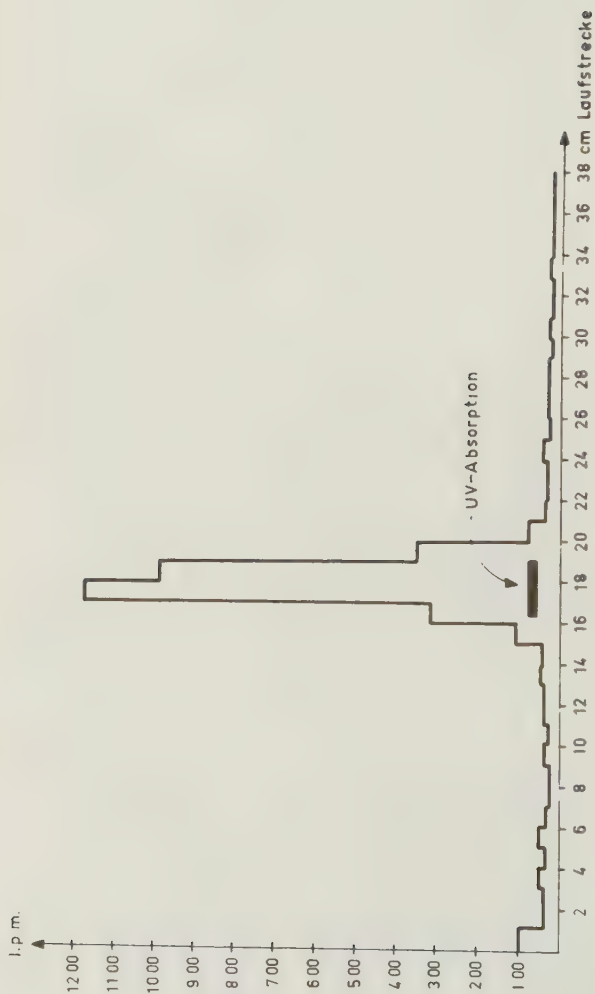


Abb. 7: Papierchromatographische Isolierung von Thymidin als Reaktionsprodukt bei der Thymidylatsynthetase-Reaktion.
Die Thyminnucleotidsynthese läßt sich durch die Bestimmung des Einbaus von ^{14}C -Formaldehyd in Thyminnucleotide quantitativ erfassen. Hierzu werden die Thyminnucleotide in das Nucleosid Thymidin überführt und dieses durch Chromatographie abgetrennt.

In einer Reihe von Experimenten wird auf die Spaltung der markierten Nucleotide in Nucleoside (Dephosphorylierung) verzichtet. In diesen Reaktionsansätzen werden die ^{14}C -markierten Substanzen säulenchromatographisch getrennt und der Radioaktivitätseinbau in die Nucleotide ermittelt.

Die Ausführung dieser Versuche wird später beschrieben.

- 1.412.2 Messung der Bildung von 5-Methylpyrimidindesoxyribonucleotiden unter Verwendung von $\alpha^{32}\text{P}$ -markiertem Desoxycytidin-5'-triphosphat.

Prinzip: $\alpha^{32}\text{P}$ -markiertes Desoxycytidin-5'-triphosphat dient als Acceptor nucleotid für die Methylgruppe. Gebildete 5-Methylpyrimidindesoxyribonucleotide werden säulenchromatographisch isoliert und durch Messung der Radioaktivität quantitativ bestimmt.

Die Ausführung dieser Versuche, die der Charakterisierung der entstehenden Methylierungsprodukte dienen, wird später beschrieben.

- 1.42 Messung der Aktivität der Desaminasen

Untersucht wurden die Desaminierungen von Cytidin, Desoxycytidin, 5-Methyldeoxycytidin, Cytidin-5-monophosphat, Cytidin-5'-diphosphat und Cytidin-5'-triphosphat, Desoxycytidin-5'-monophosphat, Desoxycytidin-5'-diphosphat und Desoxycytidin-5'-triphosphat, 5-Methyldeoxycytidin-5'-monophosphat und 5-Methyldeoxycytidin-5'-triphosphat.

Prinzip: Bei der Desaminierung von 4-Aminopyrimidinverbindungen zu 4-Hydroxypyrimidinverbindungen treten Verschiebungen der UV-Absorptionsspektren auf. Bei der Bestimmung der recht hohen Aktivitäten der Cytosinribonucleosid- bzw. Cytosindesoxyribonucleosiddesaminasen kann die Messung der Extinktionsänderungen unmittelbar in der Versuchsküvette erfolgen (kinetischer Test). Die Messung der Extinktionsänderungen bei den geringen Aktivitäten der Cytosindesoxy-

ribonucleosid-5'-phosphatdesaminasen erfolgt nach Ansäuern bei pH 1 bis 2, um größere Extinktionsdifferenzen zu erzielen.

Ausführung der Bestimmungen:

1.421 Cytosinnucleosiddesaminasen

Testmischung:

Nucleosid	$3.3 \times 10^{-4} \text{ M}$
MgCl ₂	$1 \times 10^{-2} \text{ M}$
Diaethanolamin-HCl-Puffer (pH 9.4)	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$

2.9 ml dieser Testlösung und 1 ml Enzym werden in eine Küvette gegeben. Die Extinktionsänderung wird bei den in Tabelle 3 angegebenen Wellenlängen verfolgt. Als Leerwert dient eine Küvette, die anstelle des Enzyms H₂O enthält.

Tabelle 3

Extinktionsänderungen bei der Desaminierung von Cytosin und Cytosinnucleosiden

Reaktion	pH	λ (m μ)	Extinktionsänderungen beim Umsatz von 1,0 μ Mol/ml (in 0,001 Extinktionsein- heiten)
C ——— U	7,4	280	- 2320
	9,2	292	- 2130
	14	297	- 980
CR ——— UR dCR ——— dUR	7,4	282	- 3620
	9,2	282	- 4400
	14	280	- 5150
MedCR ——— dTR	7,4	287	- 3250
	9,2	287	- 3250
	14	295	- 4700
BrdCR ——— BrdUR	7,4	302	- 1650
	9,2	298	- 2820
	14	298	- 3100

Die Koeffizienten für die Extinktionsänderungen werden experimentell wie folgt bestimmt: Von den Cytosinnucleosiden und ihren Derivaten (CR, dCR, 5-MedCR, 5-BrdCR, 5-CldCR, 5-JdCR) werden genau eingestellte Lösungen bei den angegebenen pH-Werten hergestellt. Von diesen werden gegen die Lösungen der entsprechenden Desaminierungsprodukte (UR, dUR, dTR, 5-BrdUR, 5-JdUR) Differenzspektren aufgenommen und daraus die angegebenen Maxima der Extinktionsänderungen und die Koeffizienten ermittelt. Die so für Nucleoside erhaltenen Daten können unter Beachtung der pH-Werte in gleicher Weise für die Bestimmung der Aktivität von Cytosinnucleotiddesaminasen verwendet werden, da zwischen entsprechenden Nucleosiden und Nucleotiden keine Unterschiede in den UV-Absorptionsspektren bestehen.

1.422 Cytosindesoxyribonucleotiddesaminasen

Testmischung:

Nucleotid	$3.3 - 4.3 \times 10^{-4} \text{ M}$
MgCl ₂	$4 \times 10^{-3} \text{ M}$
Tris-HCl-Puffer (pH 7.5)	$3 \times 10^{-2} \text{ M}$

Von dem Gemisch werden 2.25 ml zur Zeit $t = 0$ mit 0.15 ml 2 M HClO₄ versetzt. Die gleiche Menge Gemisch wird nach der Inkubation (120 Min.; Schütteln bei 37°C) mit der entsprechenden Menge HClO₄ versetzt. Kontrollen mit völlig gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne Nucleotid, werden in gleicher Weise behandelt. Die Proben werden nach Zugabe von HClO₄ mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 8.00 ml aufgefüllt und 60 Min. in der Ultrazentrifuge (10 000 x g) zentrifugiert. Von den Überständen werden UV-Absorptionsspektren aufgenommen und aus den Extinktionsänderungen unter Verwendung der oben angegebenen Koeffizienten die Enzymaktivitäten berechnet.

1.5 Verwendete Substanzen

Alle verwendeten Pyrimidinbasen, Nucleoside und Nucleotide wurden von der Firma CALBIOCHEM AG, Luzern, Tetrahydrofolsäure von der SIGMA Chemical Comp., St.Louis, Miss./USA, ATP, PEBTS und Pyruvatkinase von der Firma Boehringer und Söhne, Mannheim, bezogen.

^{14}C -markierter Formaldehyd war ein Präparat der New England Nuclear Corp., Boston, Mass./USA.

^{32}P -markierter Desoxycytidin-5'-triphosphat ein Präparat der International Chemical and Nuclear Corp., City of Industry, Cal./USA.

Ionenaustauscher lieferte die Firma SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg.

2 Ergebnisse

2.1 Die Aktivität der Thymidylatsynthetase aus *E. coli* und aus Kalbsthymus mit verschiedenen Substraten.

Nachfolgend werden im wesentlichen Untersuchungen über Reaktionen der Thyminnucleotidbiosynthese in Zellen von *E. coli* beschrieben. Im Vergleich dazu wird über einige Experimente zur Thyminnucleotidbiosynthese in Kalbsthymus berichtet (51,43). Kalbsthymus eignet sich für derartige Untersuchungen aufgrund seiner hohen DNS-Synthese ("Thymonucleinsäure") und der damit verbundenen intensiven Synthese von Thyminnucleotiden besonders gut.

2.11 Zunächst wird die Aktivität der Thymidylatsynthetase mit spektrophotometrischen und radioaktiven Testsystemen an rohen Extrakten von *E. coli* untersucht (99,100). Als Acceptoren für die Methylgruppe dienen verschiedene Pyrimidinnucleotide. Die Zellen werden für die Experimente auf synthetischem Medium bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase gezüchtet und zu zellfreien Extrakten verarbeitet (siehe 1.13), an denen die Aktivitätsbestimmungen erfolgen (siehe 1.41). Entsprechende Messungen am gereinigten Enzym aus *E. coli* (siehe 1.37) werden diesen Bestimmungen gegenüber gestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Aus der Tabelle läßt sich folgendes ableiten:

1. Die Aktivitätsbestimmungen mittels der spektrophotometrischen Methode und der Messung des Einbaues von ^{14}C -Formaldehyd ergeben weitgehend übereinstimmende Werte.

Tabelle 4

Bildung von Thyminnucleotiden durch rohe Extrakte von E. coli
sowie durch gereinigte Thymidylatsynthetase aus dem gleichen
Organismus

Nucleotide	µMol gebildete Thyminnucleotide/mg Protein x h ⁻¹			
	Rohextrakt		gereinigtes Enzym	
	a	b	a	b
dUMP	3.1	2.9	460	535
dUMP + ATP	3.1	2.5	425	410
dUDP	1.0	0.7	< 0.2	< 0.2
dUDP + ATP	1.1	1.0	< 0.2	< 0.2
dUTP	1.8	1.2	3.3	4.1
dUTP + ATP	1.6	0.6	2.7	2.0
dCMP	< 0.2	< 0.1	< 0.2	< 0.2
dCMP + ATP	4.2	3.3	< 0.2	< 0.2
dCDP	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
dCDP + ATP	3.9	3.2	< 0.2	< 0.2
dCTP	3.4	3.0	5.2	3.4
dCTP + ATP	4.4	3.6	7.3	6.6
dUMP + dCTP	6.5	5.7	439	442
dUMP + dCTP + ATP	7.1	6.8	488	471
dUMP + TMP	3.0	2.4	465	483
dUMP + TTP	2.7	2.5	335	310
5-MedCMP	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
dUMP + 5-MedCMP	3.3	3.2	433	426
dUMP + 5-MedCTP	3.1	3.0	422	439
UMP	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2

Die Spalte a gibt jeweils die spektrophotometrisch bestimmte, die Spalte b die durch Messung des Einbaues von ¹⁴C-Formaldehyd ermittelte Enzymaktivität an. Beschreibung der Testsysteme siehe 1.411, 1.412.1.

Nucleotidkonzentration bei allen Ansätzen 5×10^{-4} M; ATP-Konzentration 1×10^{-3} M.

2. Desoxyuridin-5'-monophosphat und Desoxycytidin-5'-triphosphat werden durch den Rohextrakt etwa gleich gut als Substrate für die Thyminnucleotidbiosynthese verwertet. Desoxycytidin-5'-monophosphat und Desoxycytidin-5'-diphosphat werden nur in Gegenwart von ATP umgesetzt. Die Synthese mit Desoxyuridin-5'-monophosphat als Substrat wird durch ATP nicht beeinflußt, während sie mit Desoxycytidin-5'-triphosphat durch ATP geringfügig gesteigert wird.
3. Mit Desoxyuridin-5'-diphosphat und Desoxyuridin-5'-triphosphat wird durch den Rohextrakt sowohl ohne ATP als auch in Gegenwart von ATP eine geringe Menge von Thyminnucleotiden gebildet. Dazu ist eine Dephosphorylierung des Nucleosid-5'-diphosphates bzw. -triphosphates zum Nucleosid-5'-monophosphat durch die spezifische Desoxyuridin-5'-diphosphatphosphatase bzw. Desoxyuridin-5'-triphosphatpyrophosphatase erforderlich. Beide Enzyme wurden in *E. coli* nachgewiesen und zeigen sehr hohe Aktivitäten (8) (siehe 0.21). Kinetische Untersuchungen von HINTZE (46) konnten diese Annahme stützen. Es ließ sich zeigen, daß die Bildung von Thyminnucleotiden aus Desoxyuridin-5'-triphosphat und besonders aus Desoxyuridin-5'-diphosphat im Vergleich zur Reaktion mit Desoxyuridin-5'-monophosphat erst mit einer Verzögerung von einigen Minuten einsetzt. Diese Zeit ist wahrscheinlich erforderlich, um eine hinreichend hohe Konzentration an Desoxyuridin-5'-monophosphat für die Synthese von Thymidin-5'-monophosphat zu erreichen. Ebenso spricht die sehr geringe Thyminnucleotidbiosynthese aus Desoxyuridin-5'-diphosphat bzw. -triphosphat durch das gereinigte Enzym für einen derartigen Reaktionsablauf. Bei der Präparation der Thymidylatsynthetase gehen Phosphatase und Pyrophosphatase weitgehend verloren, so daß Desoxyuridin-5'-diphosphat und Desoxy-

uridin-5'-triphosphat nicht zu Desoxyuridin-5'-monophosphat dephosphoryliert werden können.

4. Das gereinigte Enzym synthetisiert Thyminnucleotide nur mit Desoxyuridin-5'-monophosphat als Acceptor-nucleotid: Alle anderen Nucleotide sowie die Anwesenheit von ATP haben keinen wesentlichen Einfluß auf die Thyminnucleotidsynthese. Möglicherweise bildet Thymidin-5'-triphosphat eine Ausnahme (siehe unten).
5. Gibt man Desoxyuridin-5'-monophosphat zusammen mit Desoxycytidin-5'-triphosphat in den Reaktionsansatz, erfolgt eine vermehrte Bildung von Thyminnucleotiden. Sie entspricht annähernd der Summe der Aktivitäten mit Desoxyuridin-5'-monophosphat und Desoxycytidin-5'-triphosphat allein. Diese Beobachtung kann in zweifacher Weise gedeutet werden: Desoxycytidin-5'-triphosphat bewirkt eine Aktivierung der Bildung von Thyminnucleotiden aus Desoxyuridin-5'-monophosphat. Es ist jedoch auch möglich, daß Desoxycytidin-5'-triphosphat selbst durch ein zweites Enzym als Substrat für die Synthese von Thyminnucleotiden Verwendung findet. Für die zweite Möglichkeit spricht die unter 4. aufgeführte Beobachtung, daß bei der Reinigung der Thymidylatsynthetase die Fähigkeit zur Bildung von Thyminnucleotiden aus Desoxycytidin-5'-triphosphat fast vollständig verloren geht. Desgleichen läßt sich durch Desoxycytidin-5'-triphosphat keine Aktivierung der Synthese von Thyminnucleotiden aus Desoxyuridin-5'-monophosphat erzielen. Es scheinen im Rohextrakt somit zwei Enzyme bzw. Enzymsysteme vorhanden zu sein, die die Synthese von 5-Methyl-desoxy-pyrimidinnucleotiden ermöglichen. Das eine Enzym ist die Thymidylatsynthetase ($dUMP + {}^{14}C_1$ TMP), das andere Enzym überträgt eine Methylgruppe auf Desoxycytidin-5'-triphosphat. Diese Reaktion wird später genauer diskutiert.

6. Im rohen Extrakt wie am gereinigten Enzym läßt sich eine Hemmung der Thyminnucleotidsynthese durch Thymidin-5'-triphosphat nachweisen. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um zu prüfen, ob es sich hierbei um eine allosterische Hemmung handelt.

2.12 Die Ergebnisse entsprechender Experimente mit rohen Extrakten und der gereinigten Thymidylatsynthetase aus Kalbsthymus sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5

Bildung von Thyminnucleotiden durch rohe Extrakte von Kalbsthymus sowie durch gereinigte Thymidylatsynthetase aus dem gleichen Organ

Nucleotide	$\mu\text{Mol gebildete Thyminnucleotide/mg Protein}$ $\times \text{h}^{-1}$		
	Rohextrakt	gereinigtes Enzym	
	a	a	b
dUMP	13.5	450	512
dUMP + ATP	10.0	500	560
dCMP	5.5	49	67
dCMP + ATP	5.0	134	143
dCDP	0.5	25	<1.0
dCDP + ATP	1.0	90	<1.0
dCTP	1.4	<1.0	<1.0
dCTP + ATP	2.4	50	16
dUMP + TTP	13.3	--	--
dCMP + TTP	1.1	2.1	--
UMP	<1.0	<1.0	<1.0

Bei rohen Extrakten gelingt eine zuverlässige Bestimmung der Thyminnucleotidsynthese nur mit dem spektrophotometrischen Test. Die Aktivität des gereinigten Enzyms wird sowohl spek-

trophotometrisch (Spalte a) als auch durch Messung des Einbaues von ^{14}C -Formaldehyd (Spalte b) ermittelt. Ausführung der Bestimmungen siehe 1.411; 1.412.1. Nucleotidkonzentration bei allen Ansätzen 5×10^{-4} M; ATP-Konzentration 1×10^{-3} M.

Die in Tabelle 5 zusammengestellten Ergebnisse lassen folgende Deutung zu:

1. Thyminnucleotide werden durch rohe Extrakte von Kalbsthymus aus Desoxyuridin-5'-monophosphat, Desoxycytidin-5'-monophosphat, Desoxycytidin-5'-diphosphat und Desoxycytidin-5'-triphosphat gebildet. Bei den Cytosindesoxyribonucleotiden geht der Methylierung eine Desaminierung voraus. Diese Reaktion wird durch die Desoxycytidin-5'-monophosphatdesaminase katalysiert. Der Nachweis dieses Enzyms in rohen Extrakten von Kalbsthymus wird später beschrieben. Desoxycytidin-5'-diphosphat und Desoxycytidin-5'-triphosphat werden durch dieses Enzym nicht desaminiert. Da die verwendeten Präparate jedoch stets Desoxycytidin-5'-monophosphat als Zerfallsprodukt enthalten, reicht dieses für eine geringe Bildung von Thyminnucleotiden nach erfolgter Desaminierung aus.
2. Das aus Kalbsthymus gereinigte Enzym bildet im wesentlichen nur mit den Acceptornucleotiden Desoxyuridin-5'-monophosphat und Desoxycytidin-5'-monophosphat Thyminnucleotide. Eine im gereinigten Enzym noch vorhandene Aktivität der Desoxycytidin-5'-monophosphatdesaminase ist die Ursache für die Bildung von Thyminnucleotiden aus Desoxycytidin-5'-triphosphat. Zugewetztes Thymidin-5'-monophosphat in einer dem Desoxycytidin-5'-monophosphat äquimolaren Konzentration hemmt die Aktivität dieses Enzyms allosterisch (67) und verhindert weitgehend die Bildung von Thyminnucleotiden aus Desoxycytidin-5'-monophosphat. Dieser Hemmechanismus kann als Beweis für

die Notwendigkeit der Desaminierung vor der Methylierung angesehen werden.

3. Hinweise für die Bildung von 5-Methyl-desoxypyrimidin-nucleotiden aus Desoxycytidin-5'-triphosphat wie bei *E. coli* ergeben sich bei rohen Extrakten aus Kalbsthymus nicht.
4. Eine Erklärung für die bei einigen Reaktionen beobachteten Aktivierungseffekte von ATP auf die Thyminnucleotidsynthese läßt sich nicht geben.
5. Eine Hemmung der Thymidylatsynthetaseaktivität durch Thymidin-5'-triphosphat ist am Rohsaft wie am gereinigten Enzym aus Kalbsthymus nicht nachweisbar.

2.2 Die Abhängigkeit der Thyminnucleotidbiosynthese vom Zellwachstum

Zellen von *E. coli* werden auf synthetischem Medium M 63 unter Standardbedingungen gezüchtet (siehe 1.12). Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte (siehe Abb. 8) werden die Zellen durch Zentrifugation (15 Min. bei 10 000 x g) geerntet, einmal mit dem gleichen Volumen 0.5% NaCl + 0.5% KCl gewaschen und anschließend zu zellfreien Extrakten verarbeitet. Es zeigt sich dabei (siehe Abb. 8), daß die Aktivität der Thymidylatsynthetase ($\text{dUMP} + {}^{\text{C}}_1 \longrightarrow \text{TMP}$) unabhängig vom Alter der Kultur einen konstanten Spiegel aufweist, während die Aktivität des zweiten methylierenden Enzyms ($\text{dCTP} + {}^{\text{C}}_1 \longrightarrow \text{5-MedCTP}$) mit zunehmendem Alter der Zellen stark abfällt.

2.3 Der Einfluß von Thymin, Thymidin und einiger Antimetabolite auf die Aktivität der Synthese von Thyminnucleotiden

Zellen von *E. coli* werden auf synthetischem Medium M 63 mit Zusatz der freien Base Thymin, des Nucleosids Thymidin sowie der Antimetabolite Sulfanilamid, Aminopterin und Aza-

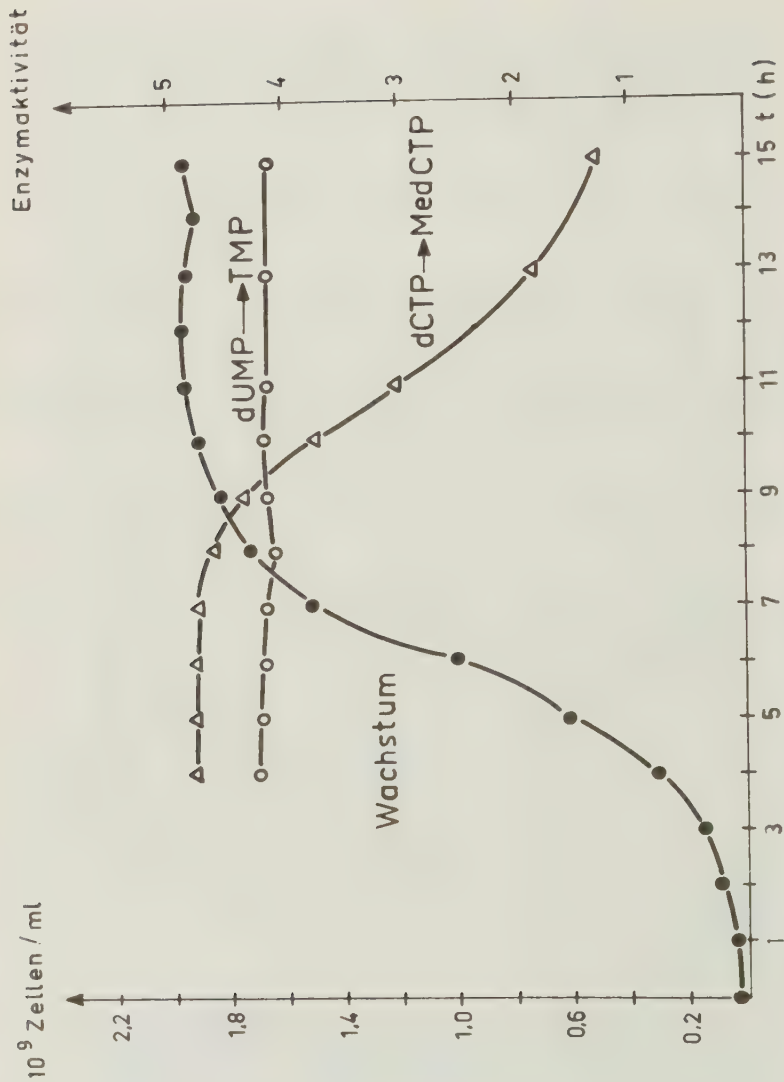


Abb. 8: Die Abhängigkeit der Thyminnucleotidsynthese mit verschiedenen Acceptor-nucleotiden vom Alter der Zellen

thymin gezüchtet. Sulfanilamid und Aminopterin sind Antimetabolite zur Folsäure bzw. ihrer Biosynthese. Das Azathymin ist ein Thyminanaloges, bei dem das Kohlenstoffatom 6 im Pyrimidinring durch ein Stickstoffatom ersetzt ist. Es entfaltet seine Wirkung als Antimetabolit, indem es anstelle von Thymin in die Thyminnucleotide und in die DNS eingebaut wird. Die Antimetabolitkonzentrationen sind so gewählt (siehe Tabelle 6), daß sie im Vergleich zu Versuchen ohne Zusatz eine 5-20%ige Hemmung des Zellwachstums bewirken. Die Zellen werden in allen Fällen am Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und nach dem bei 1.13 beschriebenen Verfahren zu zellfreien Extrakten verarbeitet. Diese werden zur Bestimmung der Aktivität der methylgruppenübertragenden Enzyme mit dem spektrophotometrischen Test (siehe 1.411) verwendet.

Wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist, werden durch Zusatz von Thymin und Thymidin zum Wachstumsmedium keine Änderungen der Aktivitäten der Thyminnucleotidsynthese erzielt. Bei Wachstum der Zellen in Gegenwart von Sulfanilamid bleibt die Aktivität ebenfalls unverändert. Aminopterin senkt die Aktivität der Thyminnucleotidbiosynthese mit Desoxyuridin-5'-monophosphat und Desoxycytidin-5'-triphosphat als Acceptor-nucleotide um etwa die Hälfte. Sehr wahrscheinlich inaktiviert Aminopterin, das vom Enzymprotein irreversibel gebunden wird, das Enzym (84). Eine Verminderung der Enzymsynthese durch Aminopterin erscheint weniger wahrscheinlich. Einen anderen Effekt zeigt Azathymin. In Gegenwart dieser Substanz bleibt die Aktivität der Thymidylat-synthetase mit Desoxyuridin-5'-monophosphat als Acceptor-nucleotid konstant, während die Aktivität des Enzyms mit Desoxycytidin-5'-triphosphat als Acceptor-nucleotid auf das 2.5- bis 4-fache ansteigt. Diese Aktivitätszunahme des Enzyms kann als Derepression gedeutet werden. Die Beobach-

Tabelle 6

Der Einfluß von Thymin, Thymidin und einiger Antimetabolite auf die Aktivität der Synthese von Thyminnucleotiden

Wachstum der Zellen in Gegenwart von	m μ Mol gebildete Thyminnucleo- tide/mg Protein x h ⁻¹	
	Acceptornucleotid	
	dUMP	dCTP
ohne Zusatz	4.6	5.1
0.1 μ Mol/ml Thymin	4.2	5.3
0.5 μ Mol/ml "	4.4	4.8
0.1 μ Mol/ml Thymidin	4.8	5.0
0.5 μ Mol/ml "	4.6	5.4
1.0 μ Mol/ml "	4.3	5.1
0.02 μ Mol/ml Sulf- anilamid	4.8	5.4
0.04 μ Mol/ml Sulf- anilamid	4.8	5.2
0.0002 μ Mol/ml Amino- pterin	4.0	2.8
0.001 μ Mol/ml Amino- pterin	2.7	2.1
0.05 μ Mol/ml Aza- thymin	4.3	12.6
0.1 μ Mol/ml Aza- thymin	4.7	19.3

Die Aktivität der Reaktionen wird im spektrophotometri-
schen Test bestimmt (siehe 1.411). Aktivitätsangaben in
m μ Mol Substratumsatz/mg Protein x h⁻¹.

tung, daß nur die Aktivität eines methylierenden Systems in Gegenwart von Azathymin verändert wird, ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die zwei verschiedenen Methylierungsprozesse auch durch unterschiedliche Enzyme katalysiert werden.

2.4 Die Thyminnucleotidbiosynthese in thyminlosen Mutanten von *E. coli*

Zellen von *E. coli* B, *E. coli* 15, *E. coli* 15 T- und *E. coli* 15 T-R, Gruppe I und II (siehe 1.11) werden auf synthetischem Medium mit Zusatz von 0.1 μ Mol Thymin/ml bis zu einer Zelldichte von $1.0 - 1.2 \times 10^9$ Zellen/ml gezüchtet. Aus den Zellen werden zellfreie Extrakte bereitet (siehe 1.13). Die Thyminnucleotidbiosynthese wird mit dem spektrophotometrischen Test bestimmt (siehe 1.411). Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse dieser Bestimmungen.

Tabelle 7

Thyminnucleotidbiosynthese in verschiedenen Zellen von *E. coli*

Reaktion	<i>E. coli</i> B	<i>E. coli</i> 15	<i>E. coli</i> 15 T-	<i>E. coli</i> 15T-R Gr. I Gr.II
$\text{dUMP} + \text{C}_1 + \text{FH}_4 \longrightarrow \text{TMP} + \text{FH}_2$	3-4	4-5	<0.2	1.3-1.5 0.2
$\text{dCTP} + \text{C}_1 + \text{FH}_4 \longrightarrow \text{MedCTP} + \text{FH}_2$	4-5	3.5-4.5	<0.2	<0.2 0.8-1.0

In den Wildtypzellen von *E. coli* B und *E. coli* 15 zeigen die Aktivitäten mit Desoxyuridin-5'-monophosphat und Desoxycytidin-5'-triphosphat als Acceptor-nucleotide etwa gleiche Größe. In der thyminlosen Mutante läßt sich keines

der beiden Enzyme nachweisen, während in der Gruppe I der Revertanten eine Aktivität nur mit Desoxyuridin-5'-monophosphat und in Gruppe II eine Aktivität nur mit Desoxycytidin-5'-triphosphat nachweisbar ist. Diese Ergebnisse zeigen, daß bei den Mutanten die de novo Synthese der Thyminnucleotide auf beiden Wegen völlig blockiert ist, während bei den Revertanten eine teilweise Restitution von jeweils einer Reaktion erfolgt ist. Eine Erklärung für diesen Befund läßt sich bisher nicht geben.

2.5 Versuche zur Identifizierung der Reaktionsprodukte bei der Methylierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat

In den vorhergehenden Abschnitten wurden Hinweise dafür erbracht, daß durch rohe Extrakte von *E. coli* eine Übertragung von Methylgruppen sowohl auf Desoxyuridin-5'-monophosphat als auch auf Desoxycytidin-5'-triphosphat erfolgen kann. Während das bei der Methylierung von Desoxyuridin-5'-monophosphat entstehende Reaktionsprodukt bereits in früheren Arbeiten als Thymidin-5'-monophosphat identifiziert wurde (31), ist noch nicht geklärt, welche Substanz bei der Methylierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat entsteht. Die Charakterisierung dieser Substanz wird im folgenden beschrieben.

2.51 In dem für die Bestimmung der Thymidylatsynthetaseaktivität mittels ^{14}C -Formaldehydeinbau verwendeten Ansatz (siehe 1.412.1) treten in den Chromatogrammen beim Einsatz von Desoxyuridin-5'-monophosphat und von Desoxycytidin-5'-triphosphat Flecke auf, die sich durch ihren Rf-Wert sowie durch Chromatographie mit nichtmarkierten Trägersubstanzen als Thymidin identifizieren lassen (siehe Abb. 9).

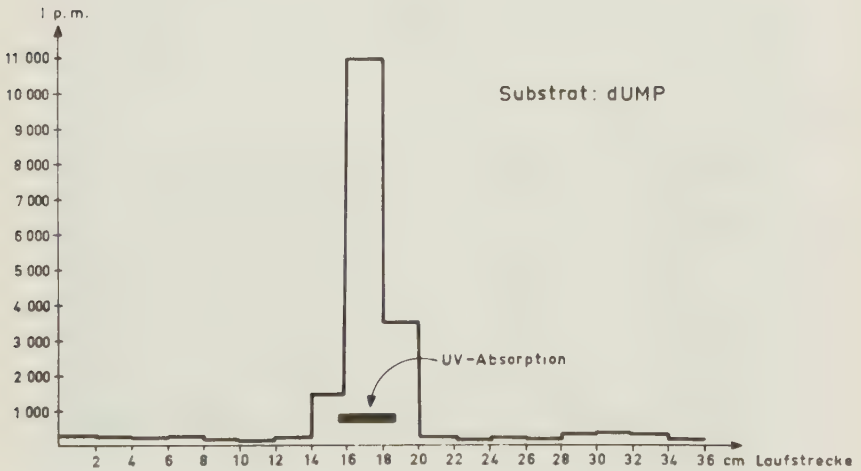
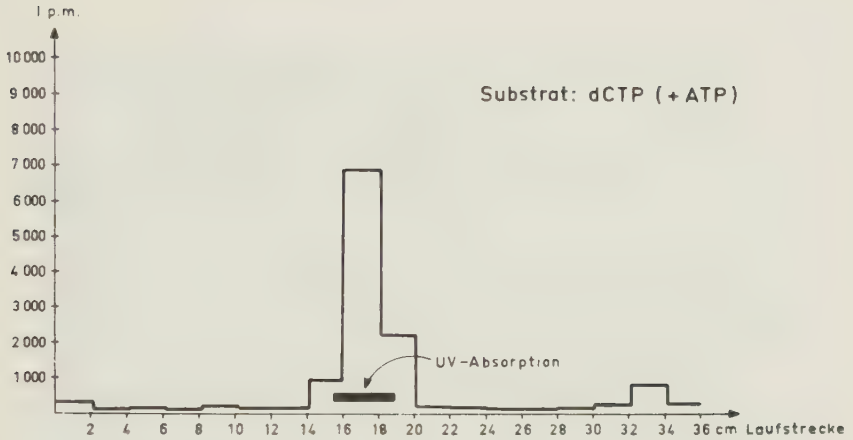


Abb. 9: Nachweis von Thymidin als Reaktionsprodukt bei der Methylierung von Pyrimidinnucleotiden

Obere Kurve - Methylierung von dCTP
 Untere Kurve - Methylierung von dUMP

Die Elution der Radioaktivität aus diesen Flecken (Zerschneiden der Flecke, 15 Min, Rühren in 0.01 N HCl, Eindampfen im Rotationsverdampfer) und anschließende Rechromatographie im gleichen Lösungsmittel (Butanol/H₂O; siehe 1.251.3) sowie im Lösungsmittel Aethanol/1 M Ammoniumacetat (7 : 3; pH 7.5) ergeben wieder einen einheitlichen Fleck, der als Thymidin identifiziert wird.

2.52 Der Abbau des bei der Methylierung entstehenden Reaktionsproduktes nach ROBERTS und FRIEDKIN (90) sowie die nachfolgende Überführung des bei dieser Reaktion entstehenden ¹⁴C-markierten Acetols in 3-Hydroxychinaldin ergibt, daß sich mehr als 90% der Radioaktivität in das 3-Hydroxychinaldin überführen lassen. Da nur aus 5-Methylpyrimidin-derivaten 3-Hydroxychinaldin gebildet werden kann, muß das unbekannte Reaktionsprodukt ein 5-Methylpyrimidin-derivat gewesen sein. Durch diese Reaktion läßt sich nicht entscheiden, ob es sich um ein Uracil- oder Cytosinderivat handelt (48).

2.531 In den üblichen radioaktiven Ansätzen zur Bestimmung der Aktivität der methylierenden Enzyme mittels Einbau von ¹⁴C-Formaldehyd werden die entstehenden Nucleotide durch Behandlung mit Phosphodiesterase und 5'-Nucleotidase in die entsprechenden Nucleoside überführt. Nach chromatographischer Isolierung der Nucleoside wird die inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Das folgende Experiment dient dem Versuch der säulenchromatographischen Isolierung der entstandenen 5-Methylpyrimidin-desoxy-5'-ribonucleotide ohne vorherigen Abbau zu den entsprechenden Nucleosiden.

Versuchsansatz:

In einem Gesamtvolumen von 10.0 ml sind enthalten: Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.4; 0.02 M), Mercaptoaethanol (0.05 M), MgCl₂ (0.01 M), ¹⁴C-Formaldehyd (0.02 M; 10 µC

Radioaktivität enthaltend), D,L-Tetrahydrofolsäure (5×10^{-4} M), Desoxycytidin-5'-triphosphat (2×10^{-4} M), ATP (2×10^{-5} M), Kreatinphosphat (4×10^{-4} M), Kreatinphosphokinase (2 mg; als ATP-regenerierendes System) und Rohenzym (5.0 ml) aus E. coli.

Dieser Ansatz wird unter Stickstoff 60 Min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird im Eisbad durch Zusetzen von 2.0 ml 2 M HClO_4 abgestoppt. Protein wird durch Zentrifugieren (5 Min. bei $10\,000 \times g$) entfernt und der Überstand durch Zugabe von etwa 2.0 ml 1 N KOH auf pH 7- 8 gebracht. Ausgefallenes KClO_4 wird nach 30 Min. Stehen im Eisbad durch Zentrifugieren entfernt. Der Überstand wird säulenchromatographisch aufgetrennt. Verwendet wird dazu eine DOWEX-1-Formiat-Säule (DOWEX 1, X 8, 200 - 400 mesh; 30 cm Höhe; 1 cm Durchmesser). Die Säulen und die eluierten Fraktionen werden bei $2 - 4^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Durchfließgeschwindigkeit beträgt 50 - 60 ml/Min., die Größe der einzelnen Fraktionen 6.0 ml. Eluiert wird mit einem linearen Gradienten von Ammoniumformiat. Bei Beginn der Elution enthält das Mischgefäß H_2O , das Reservoir 2 M Ammoniumformiat. Die Konzentration des Elutionsmittels in den einzelnen Fraktionen wird nach der auf Seite 15 wiedergegebenen Formel errechnet. Die Extinktion der einzelnen Fraktionen wird fortlaufend bei $254 \text{ m}\mu$ im LKB-Uvicord-System bestimmt. Die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wird durch Scintillationszählung ermittelt (0.1 ml Probe + 10.0 ml Anisol-Dioxan-Scintillator; siehe 1.241.1). Die Ergebnisse dieser chromatographischen Trennung der Nucleotide gibt Abb. 10 wieder. Die Überlagerung der UV-Absorption mit der Radioaktivität im Chromatogramm weist darauf hin, daß die gesuchten Nucleotide in den Fraktionen 76 - 88 zu erwarten sind, die deshalb weiter analysiert werden. Von den einzelnen Proben werden zunächst in saurer und alkalischer Lösung

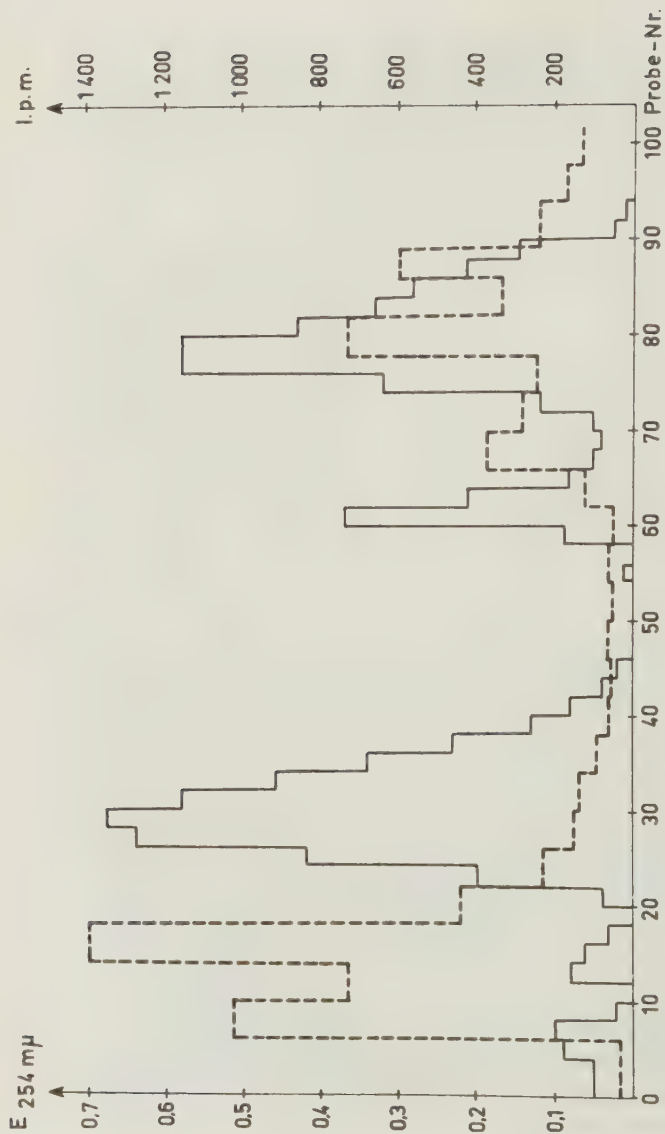


Abb. 10: Säulenchromatographische Trennung der Reaktionsprodukte der Thyminnucleotidbiosynthese mit ^{14}C -dCTP als Acceptornucleotid

Gestrichelte Kurve: Radioaktivität
 Ausgezogene Kurve: Extinktion bei 254 mμ

UV-Spektren aufgenommen. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

Absorptionsmaxima der bei der Säulenchromatographie erhaltenen Nucleotidfraktionen (Fraktion 76 - 88 in Abb.10)

Fraktion-Nr.	Absorptionsmaximum bei	
	pH 2	pH 13
76	278	-
77	278	269
78	278	270
79	278	269
80	278	269
81	278	269
82	278	269
83	277	267
84	276	266
85	274	266
86	271	264
87	267	265
88	267	263

Aus diesen Daten ist zu ersehen, daß in den Fraktionen 76 - 84 Cytidinderivate vorhanden sind (nach BEAVEN, HOLIDAY und JOHNSON (6) Absorptionsmaxima bei pH 2: 280 m μ ; pH 13: 271 m μ). In den Fraktionen 85 - 88 überwiegen Thymidinderivate (Absorptionsmaxima nach den gleichen Autoren (6) bei pH 2 und pH 13: 267 m μ). Hinweise für das Vorhandensein von 5-Methyldeoxycytidinderivaten ergeben sich aus den Spektren nicht, da ihre Absorptionsmaxima in einem längerwelligen Bereich liegen (pH 2:

287 $\mu\mu$; pH 13: 277 $\mu\mu$). Phosphatanalysen der einzelnen Fraktionen ergeben stets ein Phosphat/Basenverhältnis von 2.8, in einigen Proben bis zu 3.4. Das ist als Beweis dafür zu werten, daß in den Fraktionen wirklich Nucleosid-5'-triphosphate vorhanden sind. Die zu hohen Phosphatwerte dürften durch anorganisches Phosphat als Verunreinigung zustande kommen. Eine eindeutige Unterscheidung der vorliegenden Nucleotide ist nicht möglich.

Zur weiteren Identifizierung der in den Fraktionen 76 - 88 enthaltenen Nucleotide werden die Fraktionen 76 - 84 und 85 - 88 vereinigt, mit 1 N HCl auf pH 1 - 1.5 gebracht und 10 Min. in ein kochendes Wasserbad gestellt, um labil gebundenes Phosphat (Nucleosid-5'-triphosphate und Nucleosid-5'-diphosphate) abzuspalten. Die entstandenen Nucleosid-5'-monophosphate werden anschließend mit 1 N NaOH neutralisiert und im Rotationsverdampfer (Badtemperatur 37°C) bis zur Trockenheit eingengt. Der Rückstand wird in 0.2 ml H₂O gelöst. Davon werden 0.05 ml auf Whatman-I-Papier aufgetragen und die enthaltenen Nucleotide elektrophoretisch getrennt. (Hochspannungselektrophorese nach WIELAND-PFLEIDERER; Puffer: 1 ml Pyridin + 10 ml Eisessig + 0.01 M EDTA ad 300 ml; Spannung 120 Volt/cm; Laufzeit 90 Min.). Es gelingt nicht, die getrennten Substanzen auf dem Pherogramm im UV-Licht sichtbar zu machen, da die Absorption des im Puffer enthaltenen Pyridins die Absorption der Nucleotide überdeckt. Das Pherogramm wird deshalb in Streifen von 1.0 cm Breite zerschnitten und die darin enthaltene Radioaktivität ermittelt. Dabei ergibt sich, daß sowohl in den Fraktionen 76 - 84 als auch in den Fraktionen 85 - 88 jeweils zwei elektrophoretisch trennbare Komponenten vorhanden sind. Die erste Komponente entspricht mit einer Laufstrecke von 3.8 - 4.0 cm Desoxycytidin-5'-monophosphat bzw. 5-Methyldesoxycytidin-5'-monophosphat (Laufstrecke von reinen Vergleichssubstanzen im gleichen System: 3.7 cm). Die zweite

Komponente mit einer Laufstrecke von 17 - 20 cm entspricht Thymidin-5'-monophosphat (Laufstrecke der reinen Vergleichssubstanz im gleichen System: 19.5 cm). In den Fraktionen 76 - 84 enthält der Desoxycytidin-5'-monophosphat-5-Methyl-desoxycytidin-5'-monophosphat-Fleck mehr Radioaktivität als der Thymidin-5'-monophosphat-Fleck. In den Fraktionen 85 - 88 befindet sich mehr Radioaktivität in dem Thymidin-5'-monophosphat entsprechenden Fleck. Die geringe Aktivität in den einzelnen Fraktionen läßt jedoch keine exakten quantitativen Bestimmungen und keine weitergehende Identifizierung derselben zu.

- 2.532 Zur weiteren Charakterisierung des bei der Methylierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat entstehenden Reaktionsproduktes wird der unter 2.531 angegebene Versuch in veränderter Form wiederholt. Die radioaktive Markierung erfolgt nicht durch ^{14}C -Formaldehyd, sondern durch ^{32}P -Desoxycytidin-5'-triphosphat als Acceptor-nucleotid. Desoxycytidin-5'-triphosphat ist in der α -Position mit ^{32}P markiert. Die entstehenden Reaktionsprodukte werden wie oben beschrieben säulenchromatographisch getrennt und identifiziert.

Versuchsansatz:

In einem Gesamtvolumen von 10.0 ml sind enthalten: Tris-HCl-Puffer (pH 7.4; 5×10^{-2} M), Mercaptoethanol (2×10^{-2} M), MgCl_2 (1×10^{-2} M), EDTA (1×10^{-3} M), Formaldehyd (1×10^{-2} M), Desoxycytidin-5'-triphosphat (1×10^{-4} M; 50 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ ^{32}P enthaltend), ATP (1×10^{-5} M), Phosphoenolbrenztraubensäure (5×10^{-4} M), D,L-Tetrahydrofolsäure (1×10^{-3} M), Pyruvatkinase (1 mg) und Rohenzym (5.0 ml; 15.4 mg/ml Protein enthaltend). Der Ansatz wird unter Stickstoff bei 37°C 60 Min. inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt durch Zugabe von 0.5 ml 5 N HClO_4 . Bereits während der Proteinfällung wird die Probe im Eisbad gekühlt. Das denaturierte Protein wird nach 10 Min. Stehen im Eisbad abzentrifugiert (10 Min. bei 10 000 x g) und der

Überstand sorgfältig gesammelt. Ebenfalls unter Eiskühlung wird mit 2 N KOH neutralisiert (bis zum Phenolphthaleinumschlagspunkt). Die Proben werden weitere 60 Min. im Eisbad gehalten. Ausgefallenes KClO_4 wird durch erneute Zentrifugation (10 Min. bei 10 000 x g) abzentrifugiert. 6.5 ml des Überstandes werden mit je 3 μMol Thymidin-5'-monophosphat, Thymidin-5'-diphosphat und Thymidin-5'-triphosphat als Trägersubstanzen versetzt und auf eine DOWEX-1-Formiat-Säule gegeben. Dimensionen der Säule und Ausführung der Chromatographie genau wie bei dem in Abschnitt 2.531 beschriebenen Versuch. Es werden bei der Elution Fraktionen von 6 ml gesammelt. Das Ergebnis der Chromatographie gibt Abb. 11 wieder. Im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch wird jedoch in den einzelnen Fraktionen nur die Radioaktivität bestimmt (0.1 ml Probe + 10.0 ml Anisol-Dioxan-Scintillator; siehe 1.241.1). Es entstehen im wesentlichen vier eindeutige Radioaktivitätsgipfel. Durch Rechromatographie in verschiedenen Lösungsmittelsystemen (siehe 1.251) und durch Aufnehmen von UV-Spektren wird weiter identifiziert. Aufgrund dieser Daten enthält Gipfel I Desoxycytidin-5'-monophosphat und 5-Methyl-desoxycytidin-5'-monophosphat (?), Gipfel II Thymidin-5'-monophosphat, Gipfel III Thymidin-5'-diphosphat und Gipfel IV ein Gemisch von Desoxycytidin-5'-triphosphat, 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat (?) und Thymidin-5'-triphosphat sowie H_3PO_4 . Die vorstehenden Experimente werden an anderer Stelle (48) ausführlicher beschrieben. Während mit diesen Versuchen die Bildung von Thyminnucleotiden aus Desoxycytidin-5'-triphosphat eindeutig demonstriert werden kann, lassen sich 5-Methylcytosin-5'-desoxyribonucleotide als Intermediärprodukte nicht eindeutig charakterisieren.

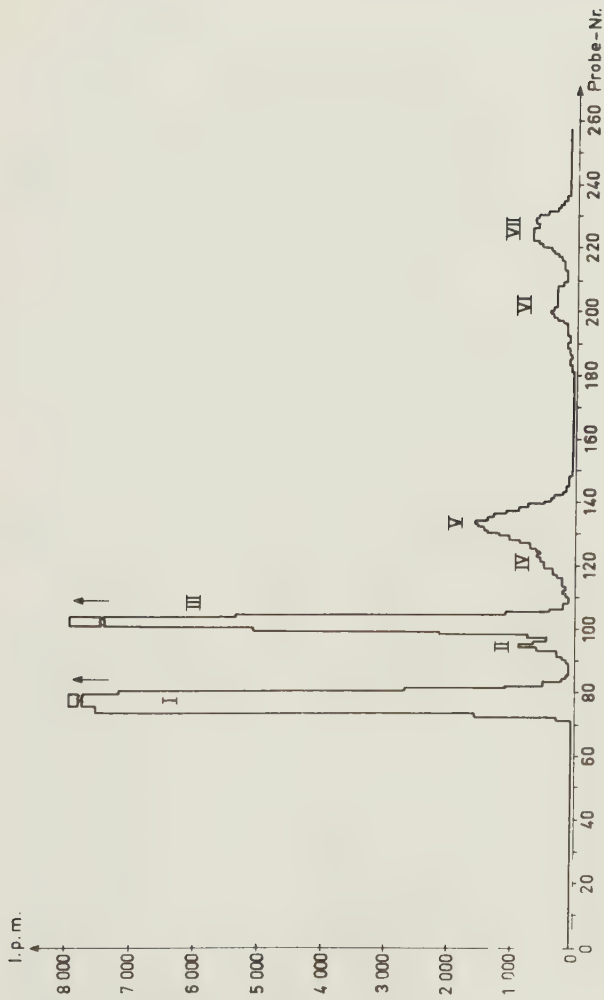


Abb. 11: Säulenchromatographische Trennung der Reaktionsprodukte der Thyminnucleotidbiosynthese mit ^{32}P -dCTP als Acceptor-nucleotid

2.6 Die Desaminierung von Cytidin, Cytosinnucleosiden und Cytosinnucleotiden

Bei den vorhergehenden Experimenten werden als Reaktionsprodukte bei der Methylierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat stets Thyminderivate gefunden. Ein sicherer Nachweis für das Vorkommen von 5-Methylcytosinderivaten läßt sich jedoch nicht erbringen. Es ergibt sich deshalb die Frage, auf welchem Weg die Umsetzung von Desoxycytidin-5'-triphosphat zu Thyminnucleotiden erfolgt. Prinzipiell sind zwei Reaktionswege möglich (Abb. 12). Desoxycytidin-5'-triphosphat kann einmal zu 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat methyliert und dieses zu Thymidin-5'-triphosphat desaminiert werden (Sequenz A in Abb. 12). Desoxycytidin-5'-triphosphat kann aber auch zunächst zu Desoxyuridin-5'-triphosphat desaminiert und dieses dann zu Thymidin-5'-triphosphat methyliert werden (Sequenz B in Abb. 12). Bei beiden Sequenzen sind Desaminierungsvorgänge notwendig. Bei Sequenz A muß die Desaminierung als 2. Schritt, bei Sequenz B als 1. Schritt erfolgen. Um zu klären, über welche von beiden Sequenzen in den Zellen die Überführung von Desoxycytidin-5'-triphosphat in Thymidin-5'-triphosphat erfolgt, werden rohe Extrakte von *E. coli* auf das Vorkommen von Desaminasen untersucht. Als Modellreaktionen für die Desaminierung von Cytosinderivaten werden zunächst die Desaminierung von Cytosinribonucleosiden und Cytosindesoxyribonucleosiden untersucht. In *E. coli* werden diese Reaktionen durch eine Desaminase katalysiert, die erstmals von COHEN und BARNER (21) nachgewiesen wurde. Die Aktivität des Enzyms wird nach der im Abschnitt 1.42 beschriebenen Methode bestimmt.

- 2.61 Nach der folgenden Vorschrift wird das Enzym aus *E. coli* angereichert: 105 g Zellen von *E. coli* (Wachstum auf synthetischem Medium M 63 bis zum Ende der logarithmischen

Phase) werden mit 315 g Alcoa A 305 im Mörser kalt verrieben. Lösliches Protein wird mit 1050 ml kaltem Tris-HCl-Puffer (0.05 M; pH 7.5; 10^{-3} M Mercaptoaethanol sowie 10^{-3} M EDTA enthaltend) extrahiert. Aluminiumoxid und Zelltrümmer werden durch Zentrifugieren (15 Min. bei 10 000 x g, anschließend 150 Min. bei 60 000 x g) entfernt. Der Überstand ergibt den Rohsaft.

Zur Fällung von Nucleinsäuren werden 850 ml Rohsaft tropfenweise unter Rühren mit 85 ml 0.25 M MnCl_2 versetzt. Es wird weiter über 30 Min. gerührt, anschließend zentrifugiert (30 Min. bei 10 000 x g). Das Sediment wird verworfen. Der Überstand wird unter Rühren mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (heiß gesättigt, mit NH_4OH auf pH 7.6 eingestellt) versetzt und 60 Min. bei 4°C gehalten. Das durch Ammoniumsulfat ausgefällte Protein wird abzentrifugiert (15 Min. bei 10 000 x g). Das Sediment wird verworfen. Dem Überstand werden langsam weitere 1700 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Nach 60 Min. Stehen bei 4°C wird 15 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 400 ml einer Lösung von 10^{-3} M EDTA und 10^{-3} M Mercaptoaethanol gelöst. Anschließend wird 6 Stunden gegen die gleiche Lösung dialysiert (3 x 10 L). - Die dialysierte Enzymlösung wird vorsichtig (unter ständigem kräftigen Rühren bei Eiskühlung) durch Zusatz von 1 N Essigsäure auf pH 4.0 gebracht. Danach wird rasch zentrifugiert (15 Min. bei 25 000 x g), das Sediment verworfen und der Überstand mit 1 N NH_4OH auf pH 7.0 - 7.4 gebracht. Diese Lösung wird erneut gegen die oben angegebene EDTA-Mercaptoaethanol-Lösung (2 x 5 L) dialysiert.

Das Dialysat wird an DEAE-Cellulose chromatographiert. Die Cellulose wird wie im Abschnitt 1.332 beschrieben präpariert. Im letzten Arbeitgang wird anstelle mit Triäthylamin-Bicarbonatpuffer mit 0.01 M Tris-Puffer (pH 7.5)

äquiliibriert. Mit der so aufbereiteten Cellulose wird eine auf 2 - 4°C gekühlte Säule von 23 cm Höhe und 3.5 cm Durchmesser gefüllt. 450 ml der Enzymlösung werden langsam auf die Säule gegeben. Die Durchlaufgeschwindigkeit beträgt 1 ml/Min.. Es werden Fraktionen von 6 ml gesammelt. Zunächst wird mit 100 ml 0.01 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) gewaschen. Anschließend wird folgender linearer Gradient angeschlossen: Mischgefäß: 1000 ml 0.01 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4), Reservoir: 1000 ml 1 M NaCl. Nach Durchlaufen von 500 ml wird der Gradient unterbrochen und weiter mit 0.5 M NaCl (120 ml) und 0.75 M NaCl (150 ml) eluiert. In allen Fraktionen werden die Extinktion bei 280 m μ sowie die Enzymaktivität bestimmt. Das Ergebnis der Chromatographie gibt Abb. 13 wieder. Die Fraktionen 130 - 155 werden vereinigt und erneut an DEAE-Sephadex-A-50 chromatographiert. Dimensionen der Säule: Durchmesser: 1 cm, Höhe: 7 cm. Die Säule wird vor dem Aufbringen des Enzyms mit 100 ml 10⁻³ M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) gewaschen. Nach Auftragen des Enzyms wird mit jeweils 8 ml 5 x 10⁻³ M, 1 x 10⁻² M, 5 x 10⁻² M, 1 x 10⁻² M und 5 x 10⁻² M Tris-HCl-Puffer (pH. 7.4) eluiert. Die Enzymaktivität findet sich weitgehend in der vorletzten Fraktion. Die einzelnen Reinigungsschritte sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9

Anreicherung der Desoxycytidindesaminase aus E. coli

	Vol. (ml)	Gesamtakt. (μ Mol/mg/h)	Protein (mg)	Spez.Akt. (μ Mol/mg/h)	Ausbeute (%)
Rohsaft	850	36 600	20.5	2.1	100
MnCl ₂ - Überstand	865	37 800	19.0	2.3	103
55 - 75% (NH ₄) ₂ SO ₄ - Sediment	450	22 800	6.5	7.8	63
pH 4.0- Überstand	450	22 100	2.4	20.5	60
DEAE-Chro- matographie	145	7 800	0.2	107.0	21
DEAE-Sepha- dex-Chroma- tographie	5	6 900	0.8	1095	18

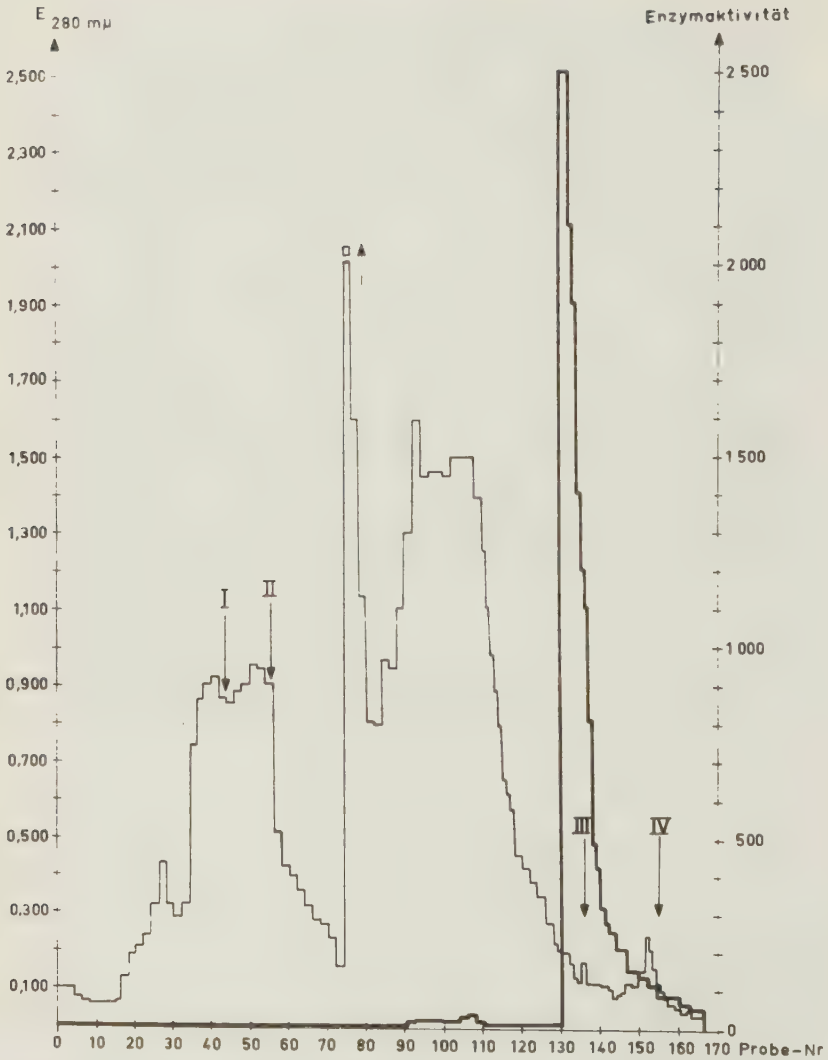


Abb. 13: Chromatographie der Cytosinnucleosidesaminase aus *E. coli* an DEAE-Cellulose
Es wird wie folgt eluiert:
I - 0.01 M Tris-HCl-Puffer
II - linearer Gradient von Tris-HCl-Puffer + NaCl
III - 0.01 M Tris-HCl-Puffer + 0.5 M NaCl
IV - 0.01 M Tris-HCl-Puffer + 0.75 M NaCl
(Einzelheiten siehe Text)

2.62 Einige Eigenschaften des Enzyms sind im folgenden zusammen-
gestellt.

Tabelle 10

Spezifität der Desoxycytidindesaminase aus E. coli

Substrat	V _{max}	K _M
Cytosin	0	-
Azacytosin	0	-
5-Methylcytosin	0	-
5-HO-Methylcytosin	0	-
5-Br-Cytosin	0	-
Cytidin	65	$4,20 \cdot 10^{-4}$
5-Methyl-desoxycytidin	110	0,12 "
5-Cl-Desoxycytidin	155	1,50 "
5-J-Desoxycytidin	355	3,45 "
Desoxycytidin	430	0,72 "
5-Br-Desoxycytidin	540	2,85 "
Azacytidin	0	-
CMP, CDP, CTP	0	-
dCMP, dCDP, dCTP	0	-
MedCMP, MedCTP	0	-

2.621 Das gereinigte Enzym zeigt eine breite Spezifität für verschiedene Cytodinnucleoside (siehe Tab. 10). Die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms ist am geringsten mit Cytidin, am höchsten mit 5-Bromdesoxycytidin. Die Affinität des Enzyms ist am größten zu 5-Methyl-desoxycytidin, am geringsten zu Cytidin (siehe K_M-Werte in Tab. 10). Freies Cytosin, verschiedene Substitutionsprodukte des Cytosins und Cytosin-nucleotide werden nicht desaminiert.

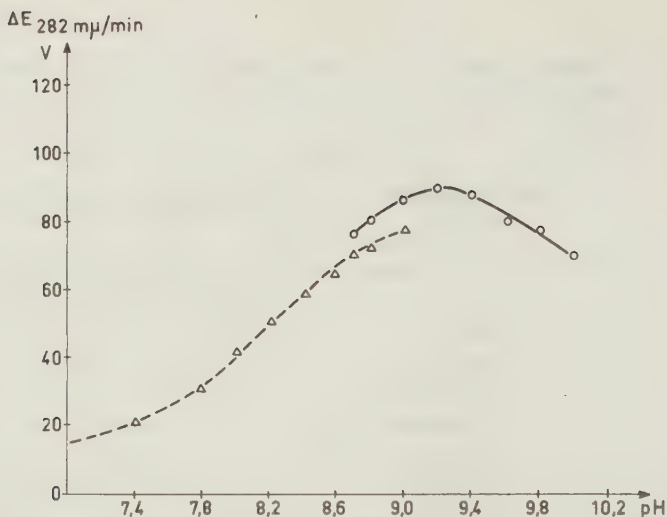


Abb. 14: pH-Abhängigkeit der Desaminierung von Desoxycytidin
 Gestrichelte Linie: Tris-HCl-Puffer
 Ausgezogene Linie: Diaethanolamin-HCl-Puffer

2.622 Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität zeigt Abb. 14. Die Aktivitätsbestimmungen in Abhängigkeit vom pH-Wert erfolgen in dem früher beschriebenen Standardansatz (siehe 1.421). Im Bereich von pH 7.0 - 9.0 werden die Messungen in Tris-HCl-Puffer, im Bereich von pH 8.5 - 10.0 in Diaethanolamin-HCl-Puffer gleicher Konzentration durchgeführt. Wie in Abb. 14 zu sehen ist, liegt das pH-Optimum der Reaktion bei pH 9.2 - 9.3.

2.623 Die gereinigte Cytosinnucleosiddesaminase wird durch verschiedene Strukturanaloge ihrer Substrate gehemmt. Abb. 15 zeigt die kompetitive Hemmung der Desaminierung von Desoxycytidin durch 4-N-Hydroxy-Desoxycytidin. Fast identische Kurven werden bei der Hemmung der gleichen Reaktion durch 4-N-Hydroxy-5-Methyldesoxycytidin erhalten. Die Desaminierung von Cytidin und 5-Methyldesoxycytidin wird ebenfalls kompetitiv durch die genannten Analogen ge-

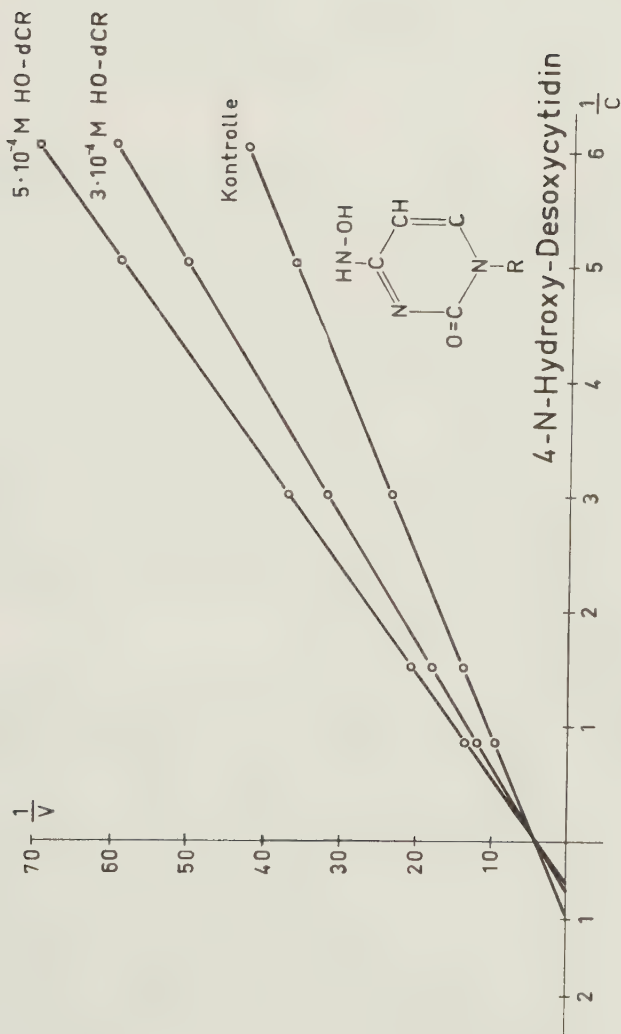


Abb. 15: Hemmung der Cytosinnucleosidesaminase durch 4-N-Hydroxy-Desoxycytidin und 4-N-Hydroxy-5-Methyl-Desoxycytidin

hemmt (17). Nicht kompetitiv gehemmt wird die Desaminierung aller drei Substrate durch das Analoge 6-Azacytidin (97). Für die Desaminierung von Desoxycytidin ist dies in Abb. 16 dargestellt. Die Hemmungskurven für Cytidin und 5-Methyl-desoxycytidin ergeben wiederum sehr ähnliche Bilder.

Beachtenswert erscheint die Hemmung des Enzyms durch Thyminnucleotide. In Abb. 17 wird die Hemmung der Desaminierung von 5-Methyl-desoxycytidin durch Thymidin-5'-triphosphat gezeigt. In Gegenwart dieser Nucleotide geht die einfache Sättigungskurve (in Abb. 17 als "Kontrolle" bezeichnet) in sigmoide Kurven über. Die stärkste Hemmwirkung wird durch Thymidin-5'-diphosphat und Thymidin-5'-triphosphat erzielt. In diesen Fällen dürfte es sich um eine allosterische Hemmung der Enzymaktivität handeln (37). Völlig gleiche Kurven ergeben sich für die Hemmung der Desaminierung von Cytidin, Desoxycytidin und 5-Bromdesoxycytidin. Andere Nucleotide, zum Beispiel Desoxycytidin-5'-monophosphat, Desoxycytidin-5'-diphosphat, Desoxycytidin-5'-triphosphat, Desoxyuridin-5'-monophosphat, Desoxyadenosin-5'-triphosphat und Desoxyguanosin-5'-triphosphat zeigen diese Hemmwirkung nicht.

- 2.624 Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der Cytosinnucleosiddesaminase werden Zellen von *E. coli* auf synthetischem Medium M 63 bis zu einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml gezüchtet, durch Zentrifugieren (15 Min. bei 10 000 x g) geerntet, einmal im gleichen Volumen 0.5% NaCl + 0.5% KCl gewaschen und erneut in frischem Medium M 63 in einer Konzentration von etwa 1×10^9 Zellen/ml resuspendiert. Diese Suspension wird 30 Min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend mit Nucleosiden versetzt. Nach Zugabe von Cytidin steigt die Aktivität des Enzyms innerhalb von 90 Min. um das Sechsfache an. Nach Zusatz anderer Nucleoside zeigt die Enzymaktivität keine wesentlichen Veränderungen

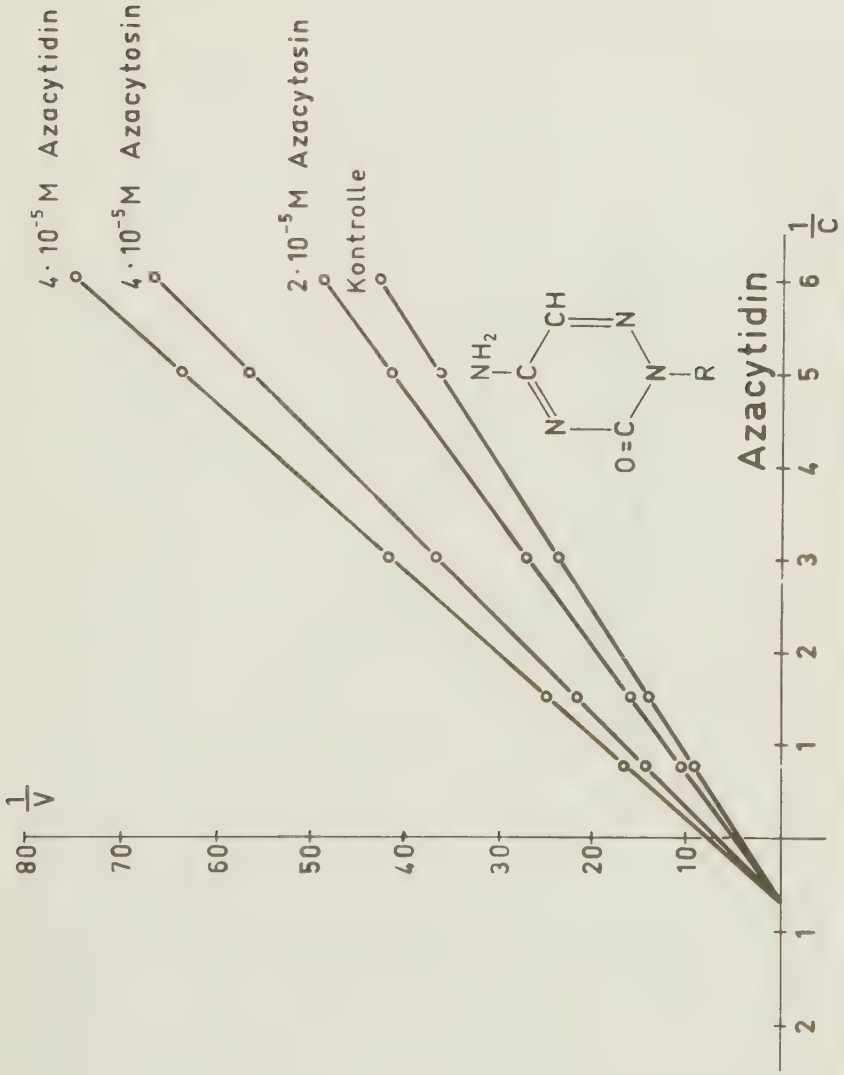


Abb. 16: Hemmung der Cytosinnucleosidasesaminase durch Azacytosin und Azacytidin

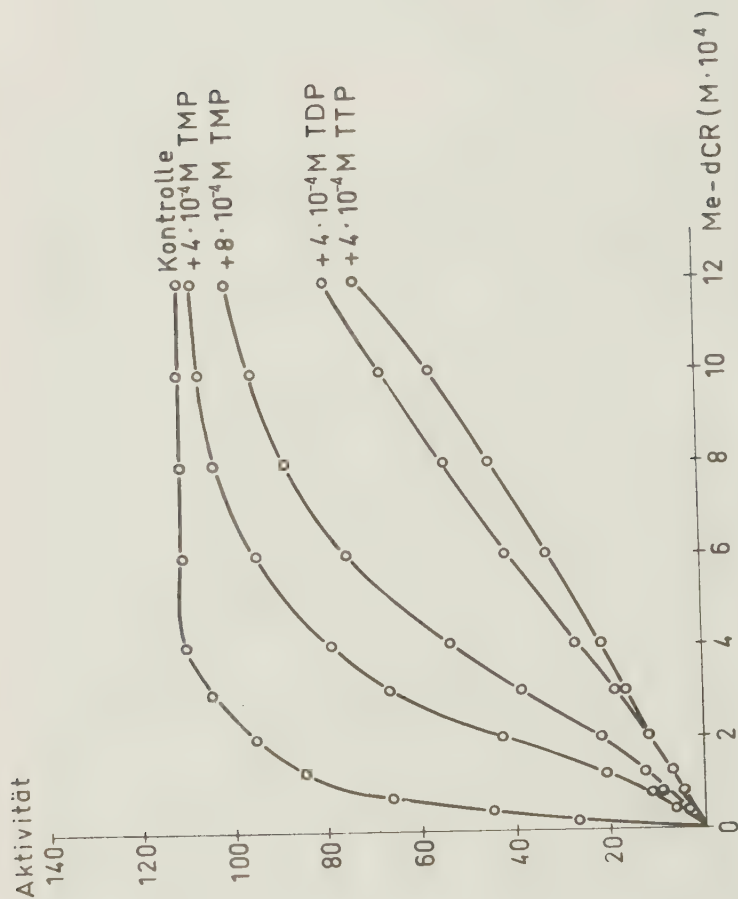


Abb. 17: Hemmung der Cytosinnucleosidesaminase durch Thyminnucleotide

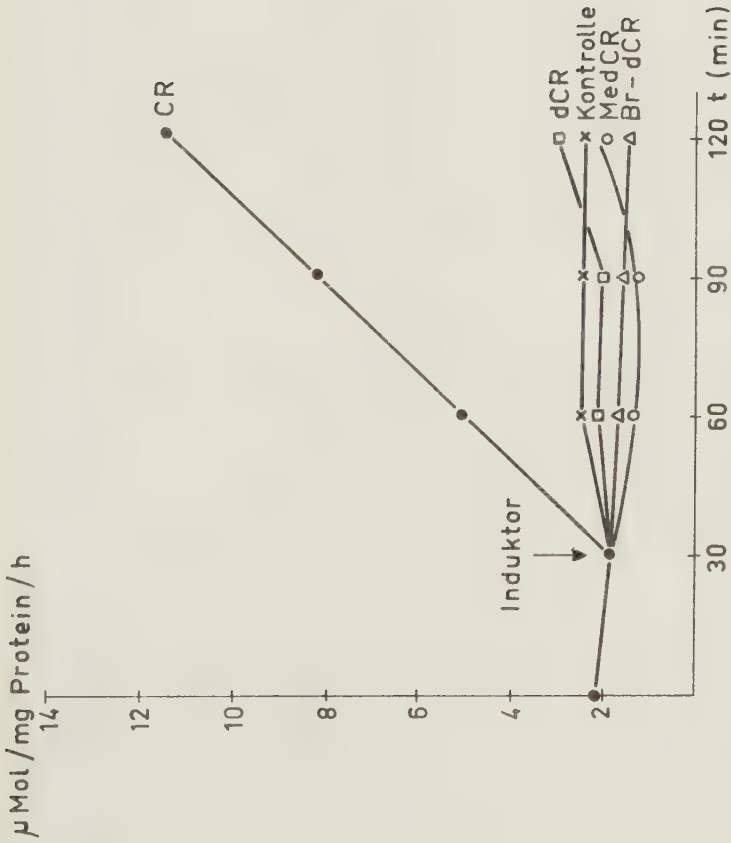


Abb. 18: Induktion der Cytosinnucleosiddesaminase durch verschiedene Nucleoside

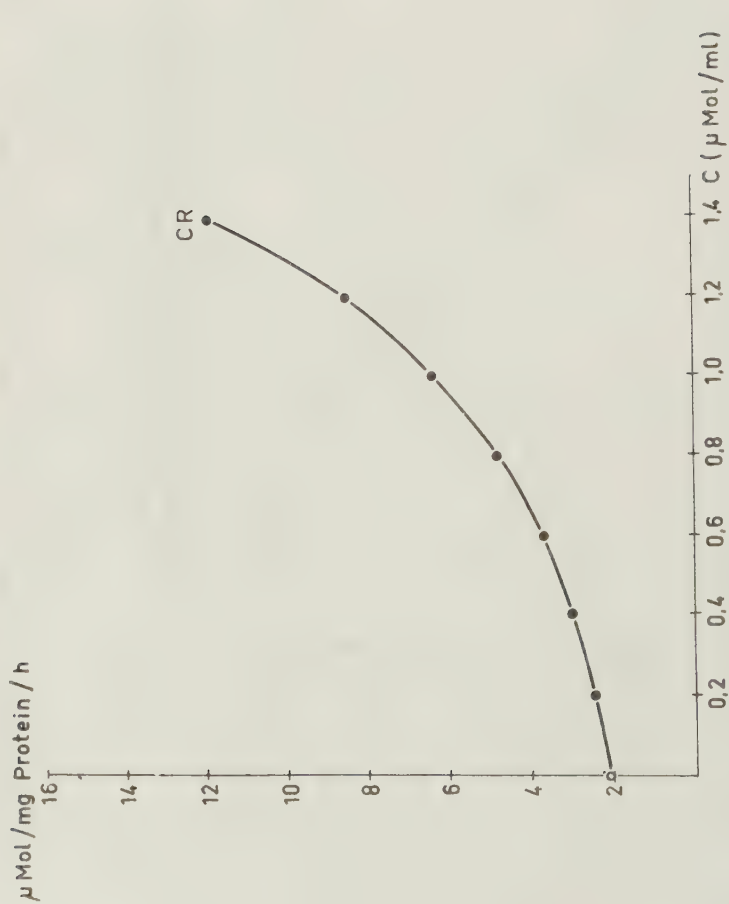


Abb. 19: Induktion der Cytosinnucleosidesaminase durch Cytidin

(Abb. 18). Es ergibt sich somit, daß das Enzym nur durch Cytidin, das ein relativ schlechtes Substrat für das Enzym ist, induziert wird. Nucleoside, die von dem Enzym wesentlich schneller umgesetzt werden, haben keine induzierende Wirkung. Die Abhängigkeit der Enzyminduktion von der Konzentration an Cytidin gibt Abb. 19 wieder. In Tabelle 11 werden die Enzymaktivitäten im rohen Extrakt von E. coli ohne Induktion, nach Induktion mit Cytidin und die Aktivität des gereinigten Enzyms mit den verschiedenen Substraten verglichen. Dabei zeigt sich, daß das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten mit verschiedenen Substraten ohne Induktion, nach Induktion (im Rohextrakt) und nach der Reinigung des Enzyms konstant bleibt. Daraus ist zu schließen, daß die untersuchten Substrate durch das gleiche Enzym umgesetzt werden.

Tabelle 11

Die Aktivität der Cytidinnucleosiddesaminase aus E. coli unter verschiedenen Bedingungen

Enzym	Aktivität mit folgenden Substraten (μ Mol/mg Protein x h ⁻¹ Substratumsatz)			Verhältnis der Aktivitäten (I : II : III)
	I CR	II dCR	III MedCR	
Rohsaft aus nicht-induzierten Zellen	2.4	15.8	4.1	1 : 6.6 : 1.7
Rohsaft aus Zellen nach Induktion mit Cytidin	12.7	87.0	17.8	1 : 6.9 : 1.4
Gereinigtes Enzym aus nichtinduzierten Zellen	1175	8400	1525	1 : 7.2 : 1.3

2.631 In tierischen Geweben findet sich ein sehr aktives Enzym, das Desoxycytidin-5'-monophosphat in Desoxyuridin-5'-monophosphat überführt (66,67,76,92). Ein derartiges Enzym konnte in *E. coli* mittels der von den Autoren angegebenen Methoden nicht nachgewiesen werden. KECK, MAHLER und FRASER (52) gelang der Nachweis dieses Enzyms in Zellen von *E. coli* nach Infektion mit T_2 -Phagen.

2.632 Ein Umsatz von Cytosinribonucleosid-5'-triphosphaten und Cytosindesoxyribonucleosid-5'-triphosphaten läßt sich mit den Methoden der Aktivitätsbestimmung der Cytosinnucleosiddesaminase in rohen Extrakten von *E. coli* nicht nachweisen. Die Umsetzung dieser Substanzen muß mit empfindlicheren Systemen geprüft werden. Dazu dient 1. der unter 1.422 beschriebene Test und 2. eine radioaktive Technik, die im folgenden noch beschrieben wird.

2.632.1 Im spektrophotometrischen Test (1.422) wird die Desaminierung von Cytidin-5'-triphosphat, Desoxycytidin-5'-triphosphat und 5-Methyldesoxycytidin-5'-triphosphat bei pH 7.4 und 9.2 untersucht. Den Ablauf eines derartigen Testes für die Umsetzung von 5-Methyldesoxycytidin-5'-triphosphat gibt Abb. 20a, für Desoxycytidin-5'-triphosphat Abb. 20b wieder. Mit Desoxycytidin-5'-triphosphat als Substrat nimmt die Extinktion bei 284 m μ innerhalb von 60 Min. nur gering ab. Bei der Desaminierung von 5-Methyldesoxycytidin-5'-triphosphat ist eine deutlich meßbare, annähernd lineare Extinktionsabnahme bei 293 m μ zu beobachten. Nach den unter 1.421 und 1.422 aufgeführten Daten entspricht die Extinktionsänderung bei 293 m μ einer Desaminierung von 5-Methyldesoxycytidin-5'-triphosphat zu Thymidin-5'-triphosphat. Eine Desaminierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat zu Desoxyuridin-5'-triphosphat (bei 284 m μ) erfolgt somit nur in wesentlich geringerem Maß oder findet überhaupt nicht statt. Aus den Extinktionsänderungen bei 293 m μ läßt sich die Umsetzung des Substrates quantitativ berechnen. 5-Methyldesoxycytidin-5'-monophos-

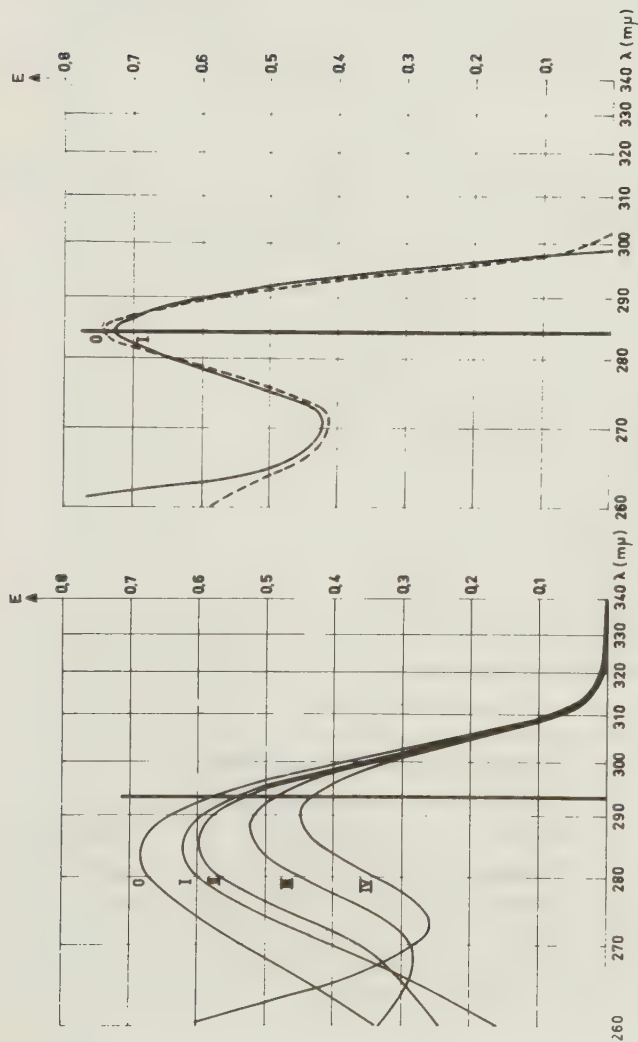


Abb. 20a (linke Kurve): Änderung der UV-Absorption bei der Desaminierung von MedCTP

Kurve 0 - vor Enzymzugabe; Kurven I-IV - 30, 60, 90 und 120 Min. nach Enzymzugabe

Abb. 20b (rechte Kurve): Änderung der UV-Absorption bei der Desaminierung von dCTP

Kurve 0 - vor Enzymzugabe; Kurve I - 60 Min nach Enzymzugabe

phat wird durch das Enzym nicht desaminiert, 5-Methyldeoxycytidin-5'-diphosphat stand als Substrat nicht zur Verfügung. Das Ribonucleosid-5'-triphosphat Cytidin-5'-triphosphat wird wie Desoxycytidin-5'-triphosphat nicht in meßbaren Mengen umgesetzt (Tabelle 12).

Tabelle 12

Die Desaminierung von Cytosinribonucleotiden und Cytosin-desoxyribonucleotiden durch rohe Extrakte von E. coli

Reaktion	pH	$\mu\text{Mol Substratumsatz/mg Protein} \times \text{h}^{-1}$
CMP $\longrightarrow$ UMP	7.4	<1
	9.2	<1
dCMP $\longrightarrow$ dUMP	7.4	<1
	9.2	<1
MedCMP $\longrightarrow$ TMP	7.4	<1
	9.2	<2
dCTP $\longrightarrow$ dUTP	7.4	<2
	9.2	<2
MedCTP $\longrightarrow$ TTP	7.4	8 - 14
	9.2	7 - 9

2.632.2 In einem weiteren Experiment wird die Desaminierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat unter Verwendung von ^{32}P -Desoxycytidin-5'-triphosphat geprüft. Mit 5-Methyldeoxycytidin-5'-triphosphat war dieses Experiment nicht durchführbar, da die Substanz bisher nicht als radioaktiv markiertes Nucleotid zur Verfügung steht. Im Versuchsansatz wird in α -Position markiertes Desoxycytidin-5'-triphosphat mit Rohenzym von E. coli inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden labile Phosphatreste durch saure Hydrolyse abgespalten und die entstehenden Nucleosid-5'-monophosphate papierchromatographisch getrennt.

Ausführung des Experimentes:

In einem Gesamtvolumen von 4.00 ml sind enthalten: Tris-HCl-Puffer (pH 7.4; 5×10^{-2} M) bzw. Diaethanolamin-HCl-Puffer (pH 9.2; 5×10^{-2} M), $MgCl_2$ (1×10^{-2} M), Desoxycytidin-5'-triphosphat (1×10^{-4} M; $1.0 \mu C/\mu Mol$ ^{32}P enthaltend) und Rohenzym aus *E. coli* (2.0 ml). Je ein Ansatz wird bei pH 7.4 und pH 9.2 ausgeführt. Inkubiert wird 60 Min. unter Schütteln bei $37^{\circ}C$. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml 5 N $HClO_4$ abgestoppt. Als Leerproben dienen völlig gleiche Ansätze, denen bereits vor dem Enzym $HClO_4$ zugesetzt wird. Ausgefallenes Protein wird durch Zentrifugation (10 Min. bei 5 000 x g) entfernt und der saure Überstand 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wird mit 2 N KOH unter Eiskühlung neutralisiert (bis zum Umschlagpunkt von Phenolphthalein) und der Ansatz weitere 30 Min. im Eisbad gehalten. Ein Niederschlag von $KClO_4$ wird abzentrifugiert (10 Min. bei 10 000 x g) und der Überstand im Rotationsverdampfer (Badtemperatur $30^{\circ}C$) bis zur Trockenheit eingengt. Der Rückstand wird in 1.0 ml H_2O gelöst und mit je $1.0 \mu Mol$ Desoxycytidin-5'-monophosphat und Desoxyuridin-5'-monophosphat als Trägersubstanzen versetzt. Von diesen Lösungen werden 0.05 bzw. 0.1 ml auf Whatman-I-Papier aufgetragen und im System Isobuttersäure/Ammoniak (siehe 1.251.1) chromatographiert. Die Lokalisation der Substanzen erfolgt durch ihre UV-Absorption. Die Verteilung der Radioaktivität auf den Chromatogrammen wird durch Radiopapierchromatographie ermittelt (siehe 1.242). Da sich die Radioaktivität ausschließlich über dem Desoxycytidin-5'-monophosphat-Fleck findet, kann die Umwandlung von Cytosindesoxyribonucleotiden in Uracildesoxyribonucleotide ausgeschlossen werden. Auf diese Weise läßt sich das Ergebnis des vorhergehenden Experimentes bestätigen.

2.7 Versuche zur Phosphorylierung von Cytosinnucleotiden

An rohen Extrakten sowie an einer nach REICHARD (88) gereinigten Cytosin-5'-monophosphatkinase wird die Phosphorylierung von Cytosin-5'-monophosphat, Desoxycytidin-5'-monophosphat und 5-Methyl-desoxycytidin-5'-monophosphat qualitativ untersucht.

Versuchsansatz:

In einem Gesamtvolumen von 0.5 ml werden unter Schütteln bei 37°C inkubiert (60 Min.): Tris-HCl-Puffer (pH 7.4 5×10^{-2} M), $MgCl_2$ (1×10^{-2} M), ATP (4×10^{-3} M), Cytidin-5'-monophosphat, Desoxycytidin-5'-monophosphat und 5-Methyl-desoxycytidin-5'-monophosphat (je 1×10^{-3} M). Die Reaktion wird nach Ablauf der Inkubationszeit durch Erhitzen in siedendem H_2O (3 Min.) abgestoppt und ausgefallenes Protein durch Zentrifugieren (5 Min. bei 10 000 x g) abgetrennt. Vom Überstand werden jeweils 0.1 ml bzw. 0.2 ml auf Whatman-I-Papier aufgetragen und im Lösungsmittel 0.1 N K-Phosphat (pH 6.8) + 4 N Ammoniumsulfat + N Propanol (100 : 60 : 2) chromatographiert. Es ergibt sich dabei, daß durch rohe Extrakte und das gereinigte Enzym Cytidin-5'-monophosphat (Rf-Wert der reinen Vergleichssubstanz: 0.67) zu Cytidin-5'-diphosphat (Rf-Wert der reinen Vergleichssubstanz: 0.72), Desoxycytidin-5'-monophosphat (Rf-Wert der reinen Vergleichssubstanz: 0.58) zu Desoxycytidin-5'-diphosphat (Rf-Wert der reinen Vergleichssubstanz: 0.64) phosphoryliert werden. 5-Methyl-desoxycytidin-5'-monophosphat (Rf-Wert der reinen Vergleichssubstanz: 0.55) wird dagegen nicht in 5-Methyl-desoxycytidin-5'-diphosphat (Rf-Wert der reinen Vergleichssubstanz: 0.64) überführt. Qualitativ läßt sich somit die Phosphorylierung von 5-Methyl-desoxycytidin-5'-monophosphat zu 5-Methyl-desoxycytidin-5'-diphosphat nicht nachweisen.

Diskussion

Ausgangspunkt für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente bilden Versuche zur Aktivitätsbestimmung der Thymidylatsynthetase in rohen Extrakten von *E. coli* (47,53,99,100). Die Synthese von Thyminnucleotiden kann aus Desoxyuridin-5'-monophosphat als Acceptor-nucleotid sowie aus Desoxycytidin-5'-triphosphat erfolgen. Letzteres kann durch Desoxycytidin-5'-monophosphat oder Desoxycytidin-5'-diphosphat bei gleichzeitigem Zusatz von ATP ersetzt werden (Tab. 4). In Gegenwart von Desoxyuridin-5'-monophosphat und Desoxycytidin-5'-triphosphat wird durch rohe Extrakte von *E. coli* etwa die doppelte Menge an Thyminnucleotiden gebildet. Gereinigte Thymidylatsynthetase aus *E. coli* (100) und aus Kalbsthymus (43,51) ist dagegen nicht in der Lage Desoxycytidin-5'-triphosphat zu methylieren (Tab. 4 und Tab. 5). Zur Bildung von Thyminnucleotiden aus Desoxycytidin-5'-triphosphat muß somit in rohen Extrakten von *E. coli* ein zweites Enzymsystem vorhanden sein (Abb. 12). Thymidin-5'-triphosphat als Reaktionsprodukt des geforderten zweiten Syntheseweges wird identifiziert durch Papierchromatographie (2.51), Säulenchromatographie (2.53), UV-Absorptionsspektren (Tab. 8), und Abbau der Thyminbase zu Acetol (2.52). Die Bildung von Thyminnucleotiden aus Desoxycytidin-5'-triphosphat läßt sich auf diese Weise mit verschiedenen Methoden eindeutig demonstrieren. Zwei nacheinander ablaufende Reaktionen sind dazu erforderlich: eine Desaminierung und eine Methylierung (Abb. 12). Die Schwierigkeit besteht in der Festlegung ihrer Reihenfolge. Bei Sequenz A in Abb. 12 erfolgt als erste Reaktion die Methylierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat zu 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat und anschließend die Desaminierung von 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat zu Thymidin-5'-triphosphat. Für den Ablauf dieser Sequenz sprechen folgende Befunde der vorgelegten Experimente:

Die chromatographische Analyse der bei dem Ablauf der Reaktion auftretenden Substanzen ergibt Hinweise für das Vorkommen von 5-Methylcytosinderivaten (Einzelheiten: 48). Ein endgültiger Beweis für das Entstehen von 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat als Intermediärprodukt konnte bisher nicht erbracht werden. Als Ursache für die negativen Ergebnisse von Versuchen zur Identifizierung von 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat wird eine rasche Desaminierung dieses Intermediärproduktes zu Thymidin-5'-triphosphat angesehen. Ein 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat desaminierendes Enzym wurde in rohen Extrakten von *E. coli* nachgewiesen. Die Aktivität dieses Enzyms, dessen exakte quantitative Bestimmung noch Schwierigkeiten bereitet, ist höher als die Aktivität des methylierenden Enzyms, das 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat bildet (Tab. 4 und Tab. 12). Es ist möglich, daß eine derartige Desaminase den Einbau von 5-Methyl-desoxycytidin-5'-triphosphat anstelle von Desoxycytidin-5'-triphosphat in die DNS verhindert (53). In vitro kann die DNS-Polymerase 5-Methyl-desoxycytidin-5'-monophosphat als Substrat für die DNS-Synthese verwenden. Durch einen ähnlichen enzymatischen Mechanismus wird in normalen Zellen von *E. coli* der Einbau von Desoxyuridin-5'-triphosphat in die DNS durch Abspaltung von Pyrophosphat verhindert (68), und in phageninfizierten Zellen von *E. coli* der Einbau von Desoxycytidin-5'-triphosphat in die DNS (53) durch Abspaltung von Pyrophosphat und nachfolgenden Desaminierung des bei der Pyrophosphatabspaltung entstandenen Desoxycytidin-5'-monophosphates (52).

Eine enzymatische Desaminierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat zu Desoxyuridin-5'-triphosphat läßt sich nicht nachweisen. Das spricht gegen den Ablauf der Sequenz B in Abb. 12.

Es stellt sich die Frage, warum in Zellen von *E. coli* Thyminnucleotide auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert werden. Eine sichere Beantwortung dieser Frage ist zur Zeit nicht möglich. Es erscheint jedoch wesentlich, daß die Thyminnucleotidsynthese aus Desoxycytidin-5'-triphosphat vorwiegend in wachsenden Zellen nachweisbar ist (Abb. 8). Die Aktivität des Enzyms fällt nach Erreichen der stationären Wachstumsphase stark ab. Es ist anzunehmen, daß die Zellen über diesen Reaktionsweg Thyminnucleotide für die vermehrte DNS-Synthese während des Wachstums bilden.

Weiterhin bestehen Hinweise für eine Bedeutung der beiden Reaktionssequenzen für die Kontrolle der Desoxyribonucleotidbildung aus Ribonucleotiden. Tab. 7 zeigt, daß in thyminlosen Mutanten von *E. coli* beide methylierenden Reaktionen ausgefallen sind. In den Revertanten läßt sich mit verringerter Aktivität jeweils eines der beiden methylierenden Enzyme nachweisen. Für die DNS-Synthese benötigen diese Revertanten kein exogenes Thymin, ihr Wachstum ist nicht verringert. In den Revertanten der Gruppe II (Tab. 7) ist die Aktivität des Nucleosid-5'-diphosphatreduktasesystems gegenüber Wildtypzellen für die Reduktion von Cytidin-5'-diphosphat zu Desoxycytidin-5'-diphosphat auf das etwa 10-fache erhöht (48). Dieser Vorgang wird als Derepression des Reduktasesystems gedeutet und wird auch bei thyminlosen Mutanten beobachtet (10). Zufuhr von exogenem Thymin oder Thymidin bewirkt bei Mutanten und Revertanten eine Repression des Reduktasesystems auf den normalen Spiegel. Nach diesen Beobachtungen ist anzunehmen, daß bei Funktionieren eines dieser Systeme genügend Thyminnucleotide für die DNS-Synthese bereitgestellt werden können, nicht jedoch für die Repression des Nucleosid-5'-diphosphatreduktasesystems (49). Die Bedeutung der intrazellulären Thyminnucleotidkonzentration für die Synthese von Makromolekülen ist noch ungeklärt (68).

An Versuchen zur Reinigung der zwei Enzyme zur Überführung von Desoxycytidin-5'-triphosphat in Thymidin-5'-triphosphat wird gearbeitet (46). Die methylierenden Enzyme konnten durch Chromatographie roher Extrakte von *E. coli* an DEÄE-Cellulose bereits weitgehend voneinander getrennt werden (30). Die Notwendigkeit besonderer Cofaktoren für die Methylierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat ist noch ungeklärt. Beobachtungen an *E. coli* (46) sowie an *Ochromonas malhamensis* (58) weisen auf eine Beteiligung von B_{12} -Co-enzymen an dieser Reaktion hin. Beide methylierenden Enzyme zeichnen sich durch eine recht hohe Konstanz ihrer Aktivität in Gegenwart verschiedener Metabolite und Antimetabolite aus (Tab. 6).

Im Zusammenhang mit der Desaminierung von 5-Methyldesoxycytidin-5'-triphosphat zu Thymidin-5'-triphosphat wurden eine Reihe anderer Desaminierungsreaktionen für Cytosinderivate untersucht. Einen Überblick über bisher bekannte Reaktionen dieser Art gibt Tab. 13.

Die Cytosinnucleosiddesaminase aus *E. coli* wurde 500-fach angereichert und in ihren Eigenschaften eingehender untersucht. Bemerkenswert ist die allosterische Hemmbarkeit des Enzyms durch Thyminnucleotide (Abb. 17) sowie die Induzierbarkeit des Enzyms durch Cytidin (Abb. 18 und 19). Beobachtungen, nach denen dieses Enzym auch durch 5-Methyldesoxycytidin induziert werden soll (105), ließen sich an Wildtypzellen von *E. coli* und in nachfolgenden Untersuchungen an thyminlosen Mutanten von *E. coli* (48) nicht bestätigen. Wahrscheinlich kommt dem Enzym eine vorwiegend katabolische Funktion zu (102). 5-Methyldesoxycytidin wird allerdings zu Thymidin desaminiert und kann dann bei thyminlosen Mutanten für die DNS-Synthese Verwendung finden (21).

Tabelle 13

Enzymatische Desaminierung von Cytosin, Cytosinnucleosiden
und Cytosinnucleotiden

Reaktion	Vorkommen	Literatur
Cytosin $\longrightarrow$ Uracil	Leber, Hefe, E. coli	20
CR $\longrightarrow$ UR dCR $\longrightarrow$ dUR 5-MedCR $\longrightarrow$ dTR	Leber, E. coli Erythrocyten	21, 22, 93 diese Arbeit
dCMP $\longrightarrow$ dUMP	Leber, Ascites- zellen, Seeigel- eier, E. coli nach T ₂ -Phagen- infektion	28, 29, 52 66, 67, 92 diese Arbeit
5-MedCTP $\longrightarrow$ TTP	E. coli	diese Arbeit

4 Zusammenfassung

- 4.1 Es werden zwei Wege für die de novo Synthese von Thymin-nucleotiden in *E. coli* aufgezeigt. Thyminnucleotide können über die bekannte Reaktionssequenz $dUMP + "C_1" \longrightarrow TMP$ und über die Sequenz $dCTP + "C_1" \longrightarrow MedCTP \longrightarrow TTP$ gebildet werden. Beide Reaktionssequenzen benötigen Tetrahydrofolsäure als methylgruppenübertragendes Coenzym.
- 4.2 Die Bildung von Thymidin-5'-triphosphat aus Desoxycytidin-5'-triphosphat verläuft in zwei Schritten. Dabei erfolgt zunächst eine Methylierung, dann die Desaminierung.
- 4.3 Die Aktivität des Enzyms für die Methylierung von Desoxycytidin-5'-triphosphat ist abhängig vom Alter der Zellen. Es zeigt eine recht hohe Aktivität in wachsenden Zellen und nur geringe Aktivität in Zellen der stationären Wachstumsphase.
- 4.4 In thyminlosen Mutanten fehlen beide methylgruppenübertragende Enzyme. Es konnten Mutanten isoliert werden, in denen entweder das eine oder das andere Enzym wieder mit verringerter Aktivität nachweisbar ist.
- 4.5 Die Bedeutung beider Reaktionssequenzen für die DNS-Synthese und für die Regulation des Desoxyribonucleotidstoffwechsels wird kurz diskutiert.
- 4.6 Als Modellreaktion für die Desaminierung von Cytosinderivaten wird die Cytosinnucleosiddesaminase eingehender untersucht. Eine 500-fache Anreicherung des Enzyms aus *E. coli*, seine Induzierbarkeit durch Cytidin sowie die allosterische Hemmung der Enzymaktivität durch Thyminnucleotide wird beschrieben.

Literaturverzeichnis

- 1 ARNSTEIN, H.R.V.
Biochim. Biophys. Acta 29, 652 (1958)
- 2 BADDILEY, J. and N.L. BLUMSON
Biochim. Biophys. Acta 39, 376 (1960)
- 3 BADDILEY, J., N.L. BLUMSON, A. DI GIROLAMO, and
M. GIROLAMO
Biochim. Biophys. Acta 50, 391 (1961)
- 4 BARKER, H.A., H. WEISSBACH, and R.D. SMYTH
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 44, 1093 (1958)
- 5 BARNER, H.D., and S.S. COHEN
J. Bacteriol. 68, 80 (1954)
- 6 BEAVER, G.H., E.R. HOLIDAY, and E.A. JOHNSON
in Nucleic Acids
(eds. E. Chargaff and J.N. Davidson),
Academic Press, New York 1955, Vol. I, S. 493
- 7 BECK, W.S., and J. HARDY
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 54, 286 (1965)
- 8 BERTANI, L.E., A. HÄGGMARK, and P. REICHARD
J. Biol. Chem. 236, PC67 (1961)
- 9 BERTANI, L.E., A. HÄGGMARK, and P. REICHARD
J. Biol. Chem. 238, 3407 (1963)
- 10 BISWAS, C., J. HARDY, and W.S. BECK
J. Biol. Chem. 240, 3631 (1965)
- 11 BLAKLEY, R.L.
J. Biol. Chem. 238, 2113 (1963)
- 12 BLAKLEY, R.L., and H.A. BARKER
Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 391 (1964)
- 13 BLAKLEY, R.L. and B.M. McDUGALL
J. Biol. Chem. 237, 812 (1962)
- 14 BLAKLEY, R.L., R.K. GHAMBEER, P.F. NIXON, and E. VITOLS
Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 439 (1965)
- 15 BLAKLEY, R.L., B.V. RAMASASTRI, and B.M. McDUGALL
J. Biol. Chem. 238, 3075 (1963)

- 16 BROWN, G.L.
Progr. in Nucleic Acid Res. 2, 259 (1963)
- 17 BROWN, D.M., and P. SCHELL
J. Mol. Biol. 3, 709 (1961)
- 18 BUCHANAN, J.M., and S.C. HARTMAN
Advanc. Enzymol. 21, 199 (1959)
- 19 BURROWS, S., F.S.M. GRYLLS, and J.S. HARRISON
Nature 170, 800 (1952)
- 20 CHARGAFF, E., and J. KREAM
J. Biol. Chem. 175, 993 (1948)
- 21 COHEN, S.S., and H.D. BARNER
J. Biol. Chem. 226, 631 (1957)
- 22 CONWAY, E.J., and R. COOKE
Biochem. J. 33, 457 (1939)
- 23 DELAMORE, I.W., and W.H. PRUSOFF
Biochem. Pharmacol. 8, 336 (1961)
- 24 DOWNING, M., A. ADAMS, and L. HELLENGA
Biochim. Biophys. Acta 108, 233 (1965)
- 25 DUNN, D.B., and J.D. SMITH
Biochem. J. 68, 627 (1958)
- 26 FISKE, C.H., and Y. SUBBAROW
J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)
- 27 FLAKS, J.G.
in Methods in Enzymology,
(eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan),
Academic Press, New York 1963, Vol. VI, S. 473
- 28 FLAKS, J.G., and S.S. COHEN
J. Biol. Chem. 234, 1501 (1959)
- 29 FLAKS, J.G., and J. LICHTENSTEIN, and S.S. COHEN
J. Biol. Chem. 234, 1507 (1959)
- 30 FÖRSTER, E., and A.W. HOLLDORF
FEBS-Abstr., 2nd Meeting, Wien 1965, S. 146
- 31 FRIEDKIN, M., and A. KORNBERG
in The Chemical Basis of Heredity
(eds. W.D. McElroy and B. Glass),
John Hopkins Press, Baltimore, 1957, S. 609

- 32 FRIEDKIN, M., and D. ROBERTS
J. Biol. Chem. 207, 245, 257 (1954)
- 33 FRIEDKIN, M., E.J. CRAWFORD, E. DONOVAN, and
E.J. PASTORE
J. Biol. Chem. 237, 3811 (1962)
- 34 FUJIMOTO, D., P.R. SRINIVASAN, and E. BOREK
Biochemistry 4, 2849 (1965)
- 35 GERHART, J.C., and A.B. PARDEE
J. Biol. Chem. 237, 891 (1962)
- 36 GERHART, J.C., and A.B. PARDEE
Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 28, 491 (1963)
- 37 GERHART, J.C., and A.B. PARDEE
Feder. Proc. 23, 727 (1964)
- 38 GHAMBEER, R.K., and R.L. BLAKLEY
Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 40 (1965)
- 39 GLASER, L.
Physiol. Rev. 43, 215 (1963)
- 40 GOLD, M., and J. HURWITZ
J. Biol. Chem. 239, 3858 und 3866 (1964)
- 41 GREENBERG, G.R.
Feder. Proc. 13, 745 (1954)
- 42 GREENBERG, G.R.
J. Biol. Chem. 219, 423 (1956)
- 43 GREENBERG, D.M., R. NATH, and G.K. HUMPHREYS
J. Biol. Chem. 236, 2271 (1961)
- 44 HARTMAN, S.C., and J.M. BUCHANAN
Ergeb. Physiol. u. exptl. Pharmacol. 50, 75 (1959)
- 45 HINKE, H.
1966, unveröffentlichte Versuche
- 46 HINTZE, D.
1966, unveröffentlichte Versuche
- 47 HOLLDORF, A.W.
1961, unveröffentlichte Versuche
- 48 HOLLDORF, A.W.
Habilitationsschrift, Freiburg 1966

- 49 HOLMGREN, A., P. REICHARD, and L. THELANDER
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 54, 830 (1965)
- 50 HOTTA, Y., and H. STERN
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 279 (1961)
- 51 JENNY, E., and D.M. GREENBERG
J. Biol. Chem. 238, 3378 (1963)
- 52 KECK, K., H.R. MAHLER, and D. FRASER
Arch. Biochem. Biophys. 86, 85 (1960)
- 53 KORNBERG, A.
Enzymatic Synthesis of DNA
John Wiley and Sons, Inc., New York 1961
- 54 KORNBERG, A., I. LIEBERMAN, and E.S. SIMMS
J. Biol. Chem. 215, 389, 417 (1955)
- 55 KORNBERG, A., S.B. ZIMMERMAN, S.R. KORNBERG, and J. JOSSE
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 45, 772 (1959)
- 56 KORNFELD, S., and L. GLASER
J. Biol. Chem. 237, 3052 (1962)
- 57 LAURENT, T.C., E.C. MOORE, and P. REICHARD
J. Biol. Chem. 239, 3436 (1964)
- 58 LETENDRE, C.H., and L.J. DANIEL
Arch. Biochem. Biophys. 113, 182 (1966)
- 59 LIEBERMAN, I., and A. KORNBERG
Biochim. Biophys. Acta 12, 223 (1953)
- 60 LIEBERMAN, I., and A. KORNBERG
J. Biol. Chem. 212, 909 (1955)
- 61 LIEBERMAN, I., A. KORNBERG, and E.S. SIMMS
J. Biol. Chem. 215, 403 (1955)
- 62 LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and
R.J. RANDALL
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 63 MAGASANIK, B., and D. KARIBIAN
J. Biol. Chem. 235, 2672 (1960)
- 64 MAGASANIK, B., E. VISCHER, R. DONIGER, D. ELSON, and
E. CHARGAFF
J. Biol. Chem. 186, 37 (1950)
- 65 MALEY, F.
Arch. Biochem. Biophys. 96, 550 (1962)

- 66 MALEY, G.F., and F. MALEY
J. Biol. Chem. 234, 2975 (1959)
- 67 MALEY, G.F., and F. MALEY
J. Biol. Chem. 239, 1168 (1963)
- 68 MAALØE, O., and N.O. KJELGAARD
Control of Macromolecular Synthesis
W.A. Benjamin Inc., New York 1966
- 69 MARKHAM, R., and J.D. SMITH
Biochem. J. 45, 294 (1949)
- 70 McDOUGALL, B.M., and R.L. BLAKLEY
J. Biol. Chem. 236, 832 (1961)
- 71 MOORE, E.C., and P. REICHARD
J. Biol. Chem. 239, 3453 (1964)
- 72 MOORE, E.C., P. REICHARD, and L. THELANDER
J. Biol. Chem. 239, 3445 (1964)
- 73 MONOD, J., J.P. CHANGEUX, and F. JACOB
J. Mol. Biol. 6, 306 (1963)
- 74 MONOD, J., and F. JACOB
Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 26, 389 (1961)
- 75 MONOD, J., J. WYMAN, and J.P. CHANGEUX
J. Mol. Biol. 12, 88 (1965)
- 76 MYERS, D.K., C.A. HEMPHILL, and C.M. TOWNSEND
Canad. J. Biochem. 39, 1043 (1961)
- 77 NEUFELD, E.F., and S.M. ILVES
Feder. Proc. 21, 80 (1962)
- 78 OKAZAKI, T., and A. KORNBERG
J. Biol. Chem. 239, 259 (1964)
- 79 OKAZAKI, R., and A. KORNBERG
J. Biol. Chem. 239, 269 (1964)
- 80 OVERHOFF, H.
Dissertation, Freiburg 1966
- 80a PARR, C.W.
Biochem. J. 56, Proc. XXVII (1954)
- 81 PASTORE, E.J., and M. FRIEDKIN
J. Biol. Chem. 237, 3802 (1962)

- 82 PAZUR, J.H., and E.W. SHUEY
J. Biol. Chem. 236, 1780 (1961)
- 83 PEABODY, R.A., D.A. GOLDTHWAIT, and G.R. GREENBERG
J. Biol. Chem. 221, 1071 (1956)
- 84 RABINOWITZ, J.C.
in The Enzymes
(eds. P.D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrbäck),
Academic Press, New York 1960, Vol. 2, S. 185
- 85 RAZZELL, W.E., and H.G. KHORANA
Biochim. Biophys. Acta 28, 562 (1958)
- 86 REICHARD, P.
Advanc. Enzymol. 21, 263 (1959)
- 87 REICHARD, P.
J. Biol. Chem. 236, 2511 (1961)
- 88 REICHARD, P.
J. Biol. Chem. 237, 3513 (1962)
- 89 REICHARD, P., A. BALDESTEN, and L. RUTBERG
J. Biol. Chem. 236, 1150 (1961)
- 90 ROBERTS, D.W., and M. FRIEDKIN
J. Biol. Chem. 233, 483 (1958)
- 91 RUSHIZKY, G.W., M. RILEY, L.S. PRESTIDGE, and
A.B. PARDEE
Biochim. Biophys. Acta 45, 70 (1960)
- 92 SCARANO, E.
J. Biol. Chem. 235, 706 (1960)
- 93 SCHMIDT, G.
Z. Physiol. Chem. 208, 185 (1932)
- 94 SHAPIRO, H.S., and E. CHARGAFF
Biochim. Biophys. Acta 39, 68 (1960)
- 95 SIEDLER, A.J., and M.T. HOLTZ
J. Biol. Chem. 238, 697 (1963)
- 96 SMITH, M., and H.G. KHORANA
in Methods in Enzymology
(eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan),
Academic Press, New York 1963, Vol. VI, S. 645
- 97 SORM, F., J. SMRT, and V. CERNECKIJ
Experientia 17, 64 (1961)

- 98 STAEHELIN, M.
Biochim. Biophys. Acta 49, 11 (1961)
- 99 WAHBA, A.J., and M. FRIEDKIN
J. Biol. Chem. 236, PC11 (1961)
- 100 WAHBA, A.J., and M. FRIEDKIN
J. Biol. Chem. 237, 3794 (1962)
- 101 WATSON, J.D., and F.H.C. CRICK
Nature 171, 737, 964 (1953)
- 102 WEIGAND, K.
Dissertation, Freiburg 1966
- 103 WOOLLEY, D.W., and J.H. KOEHLIK
Feder. Proc. 20, 359 (1961)
- 104 WYATT, G.R.
Biochem. J. 48, 584 (1951)
- 105 YANG, S.Y-S., and F. SHERMAN
Feder. Proc. 25, 705 (1966)
- 106 YATES, R.A., and A.B. PARDEE
J. Biol. Chem. 221, 743, 757 (1956)

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden in der Zeit vom 1. November 1963 bis 31. Juli 1965 im Biochemischen Institut der Universität Freiburg im Breisgau durchgeführt.

Ich danke Herrn Professor Dr. H o l z e r für den Arbeitsplatz in seinem Institut und besonders für seine großzügige Hilfe bei allen Schwierigkeiten.

Herrn Dr. H o l l d o r f bin ich für die Anleitung zur vorliegenden Arbeit und seine stets hilfsbereite Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet.

Herzlicher Dank gebührt Fräulein Marlies K o c h für ihre Hilfe bei der Ausführung der Versuche.

Lebenslauf

Als Tochter des Lehrers Herbert Förster wurde ich am 7.3.1939 in Wurzen/Sachsen geboren.

Nach bestandenem Abitur an der Oberschule Grimma/Sachsen verließ ich die Ostzone und nahm bis zum Frühjahr 1958 an einem Ergänzungslehrgang zur Reifeprüfung in Schleswig/Holstein teil. Danach begann ich in Kiel mit dem Medizinstudium und legte dort im April 1959 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. In den folgenden Semestern studierte ich an der Freien Universität Berlin und nach einjähriger Unterbrechung in Freiburg im Breisgau, wo ich im Oktober 1963 die ärztliche Vorprüfung bestand. Das medizinische Staatsexamen lege ich im Herbst 1966 an der Universität Freiburg ab.

